

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de la capacidad antimicrobiana de extractos de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito- Católica (CEQCA) sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

ROSSANA KATHERINE ROSALES DALGO

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Rossana Katherine Rosales ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Alexandra Narváez Trujillo
Directora de la Disertación
Quito, 19 de noviembre del 2018

“Science is not only a disciple of reason but, also,
one of romance and passion.”

Stephen Hawking

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Gladys y Jorge, por su sacrificio, apoyo y amor incondicional. A mis hermanos Jorge, Erika y Erick, por estar siempre a mi lado apoyándome, y ser la motivación para seguir adelante.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por el financiamiento para realizar este proyecto.

A la M. Sc. Alexandra Narváez, Directora de mi proyecto de disertación, por permitirme ser parte de su equipo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y ser una formidable guía en mi formación académica.

A Carolina Portero y Carolina Castro por guiarme en el transcurso de mi carrera y en el desarrollo de mi Trabajo de titulación, por ser un apoyo infalible en el Laboratorio.

A la Dra. Iliana Alcocer, por facilitarme los aislados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes necesarios para este proyecto, y por abrirme las puertas de su laboratorio y guiarme con sus conocimientos técnicos para poder desarrollar mi Trabajo de Titulación.

A mis amigos y compañeros: Carolina, Daniel, Viviana, Karen, Mishel, Leonardo y Eduardo, por su apoyo, consejos y afecto incondicional durante toda mi carrera.

A Miguel Ángel y Fernando Marín, por todos sus comentarios, consejos y guía para pulir este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
BLASTn	Local Alignment Tool with nucleotide database
CB-QCA	Colección Bacteriana Quito-Católica
CEQCA	Colección de Hongos Endófitos Quito-Católica
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DCM	Diclorometano
DHI	Diámetros de los Halos de Inhibición
EA	Etil-acetato
ITS	Internal Transcribed Spacer
MDR	Bacterias multirresistentes
MeOH	Metanol
MHB	Caldo Müller-Hinton
mL	Mililitros
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	Agar Dextrosa Papa
PDB	Caldo Dextrosa y Papa
PDR	Bacterias panresistentes

LISTA DE ABREVIATURAS (CONTINUACIÓN)

Abreviatura	Significado
PUCE	Pontificia Universidad Católica de Ecuador
RBC	Eritrocitos de Sangre Humana
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina
μL	Microlitros
XDR	Bacterias extremadamente resistentes

TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN DE LA DISERTACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LASTA DE TABLAS.....	xiv
LISTA DE ANEXOS.....	xvi

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 MULTIRRESISTENCIA BACTERRIANA.....	3
3.2 ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS.....	4
3.3 RESISTENCIA EN <i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.4 METABOLITOS SECUNDARIOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	6
3.5 HONGOS ENDÓFITOS COMO PRODUCTORES DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	6
3.6 EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS DE LA COLECCIÓN DE ENDÓFITOS QUITO-CATÓLICA (CEQCA).....	7

3.7 JUSTIFICACIÓN.....	8
3.8 OBJETIVOS.....	8
3.1.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. SELECCIÓN DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS.....	10
4.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS ENDÓFITOS.....	10
4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS.....	10
4.4 SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....	11
4.5 PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO.....	12
4.6 BIOENSAYOS.....	12
4.6.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC®.....	12
4.6.1.1 PROCEDIMIENTO PARA ENSAYOS DE MICRODILUCIÓN.....	13
4.6.1.2 CÁLCULOS DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.....	13
4.6.1.3 CONTROLES.....	13
4.6.1.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	14

4.6.2	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTES.....	14
4.6.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	14
4.6.4	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE MICRODILUCIÓN CONTRA CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTES.....	15
4.7	EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) O LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA (CMB).....	15
4.7.1	CONTROLES.....	16
4.7.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	16
4.8	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGO ENDÓFITOS.....	17
4.8.1	AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO DEL ADN.....	17
5.	RESULTADOS.....	18
5.1	PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO.....	18
5.2	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™.....	18
5.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTES.....	19

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	21
5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE MICRODILUCIÓN SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTES.....	21
5.6 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) O LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	23
5.7 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	23
6. DISCUSIÓN.....	24
6.1. PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO.....	24
6.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™.....	25
6.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> MULTIRRESISTENTES.....	27
6.4. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	29
6.5. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS.....	30

7. CONCLUSIONES.....	32
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
9. FIGURAS.....	46
10. TABLAS.....	50
11. ANEXOS.....	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Disposición de los extractos en las placas de microtitulación de poliestireno (COSTAR 3590) de 96 pocillos.....47
- Figura 2.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución.....47
- Figura 3.** Actividad Bactericida o Bacterioestática de los extractos que mostraron inhibición, según las lecturas de absorbancias.....48
- Figura 4.** Porcentajes de resistencia antibiótica de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a diversos antibióticos.....49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación taxonómica y solventes orgánicos de los 86 extractos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA.....	52
Tabla 2. Mecanismos de resistencia de las veintidós cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> provenientes del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.....	56
Tabla 3. Pruebas de sensibilidad fenotípica de veintidós cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes.....	57
Tabla 4. Porcentajes de inhibición de los 41 extractos con bioactividad sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™.....	58
Tabla 5. Porcentajes de inhibición y actividad bactericida/ bacterioestática de 38 extractos de hongos endófitos sobre representantes de los seis mecanismos de resistencia en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes.....	60
Tabla 6. CMI y CMB de diecinueve extractos de hongos endófitos contra cepas representantes de los seis mecanismos de resistencia en <i>S. aureus</i> multirresistente	62
Tabla 7. Porcentajes de inhibición y actividad bactericida/ bacterioestática de quince extractos orgánicos sobre dieciséis cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes según su mecanismo de resistencia.....	62

Tabla 8. Porcentajes de hemólisis de dieciséis extractos de hongos endófitos en las concentraciones ensayadas contra las veintidós cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes	63
---	----

Tabla 9. Información taxonómica molecular de seis hongos endófitos identificados en este estudio.....	64
--	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos de acción de los distintos agentes microbianos.....	66
Anexo 2. Porcentaje de inhibición y actividad bactericida y bacteriostática de veintisiete extractos de hongos endófitos de la CEQCA sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923™ según información de la base de datos de la CEQCA.....	67
Anexo 3. Consentimiento del uso de sangre para los ensayos de citotoxicidad.....	68
Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes para determinar la CMI y CMB.....	69

1. RESUMEN

La creciente resistencia a una variedad de agentes antimicrobianos constituye una amenaza para la salud pública a nivel global. Bacterias como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, constan en la lista de organismos multirresistentes publicada por la Organización Mundial de la Salud en Febrero del 2017, en donde expone la imperiosa necesidad de nuevos agentes antimicrobianos. Los hongos endófitos han demostrado ser prominentes generadores de nuevos productos naturales con una variada actividad biológica. En el presente estudio se evaluó la capacidad antibiótica de 86 extractos, obtenidos de 33 aislados de hongos endófitos de la Colección de Hongos Endófitos Quito Católica (CEQCA), contra 22 cepas de *Staphylococcus aureus*, resistentes a diversos antibióticos. La actividad antibiótica de los extractos fue evaluada *in vitro* mediante microdilución, y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Un total de 16 extractos mostraron actividad bactericida o bacterioestática sobre varias cepas de *S. aureus* multirresistentes. El extracto CEQCA-P0688 D3 procedente del hongo endófito *Fusarium oxysporum* y el extracto CEQCA-O1111D2 de un posible nuevo hongo de la división Ascomycota, inhibieron más del 90% de las cepas evaluadas, con una CMI y CMB de 5 µg/mL y 40 µg/mL, respectivamente. Ambos extractos presentaron un porcentaje hemolítico bajo, del 4,7% y 1,4%, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la alta capacidad antimicrobiana de los hongos endófitos, siendo éste una buena base para posteriores estudios contra otras bacterias multirresistentes o incluso otros patógenos humanos.

Palabras clave: citotoxicidad, concentración mínima inhibitoria y bactericida, hongos endófitos, metabolitos secundarios, *Staphylococcus aureus* multirresistente.

2. ABSTRACT

Rising resistance to a variety of antimicrobial agents constitutes a worldwide public health threat. Bacteria such as methyl-resistant *Staphylococcus aureus* are included in the list of multi-resistant organisms published by the World Health Organization in February 2017, where it exposes the urgent need to develop new antimicrobial agents. Endophytic fungi have proved to be one of the most prominent suppliers of new natural products with a variety of biological activity. In the present study, antibiotic activity of 86 extracts, retrieved from 33 endophytic fungi isolates from the Endophytic Fungi Collection Quito-Católica (CEQCA), was evaluated against 22 strains of *Staphylococcus aureus*, resistant to various antibiotics. Antibacterial activity of the extracts was evaluated *in vitro* using microdilution method where the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. A total of 16 extracts showed bactericidal or bacteriostatic activity on several strains of multiresistant *S. aureus*. The extract CEQCA-P0688 D3 retrieved from the endophyte fungus *Fusarium oxysporum* and the extract CEQCA-O1111D2 probably from a novel *Ascomycota* fungus, inhibited more than 90% of the strains evaluated, with a MIC and MBC of 5 µg / mL and 40 µg / mL, respectively. Both extracts presented low hemolytic percentages of 4.7% and 1.4%, respectively. Results obtained in this study exhibit the high antimicrobial capacity of endophytic fungi, which could lead to further studies against other multiresistant bacteria or even other human pathogens.

Key words: cytotoxicity, endophytic fungi, minimal inhibitory and bactericidal concentration, multiresistant *Staphylococcus aureus*, secondary metabolites.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 MULTIRRESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a múltiples agentes antimicrobianos es una amenaza para la salud pública a nivel global (Malhadas, Malheiro, Pereire, Guedes de Pinho y Baptista, 2017). Esta realidad se expone en el primer informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre resistencia a antimicrobianos, particularmente de doce bacterias responsables de infecciones comunes graves. En este informe, la OMS resalta la creciente resistencia de estas bacterias a una variedad de antibióticos, especialmente los utilizados como último recurso, como la colistina y los carbapenémicos; y destaca el nivel de urgencia con que se necesita la investigación y desarrollo de antibióticos más eficaces (Liu, Y. et al., 2016; Organización Mundial de la Salud, 2017).

La rápida aparición de bacterias multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR), representa, en conjunto, el 36% de los microorganismos aislados de pacientes infectados a nivel global. (Freire-Moran et al., 2011; Shamsuzzaman, 2015). Se estima que alrededor de 700.000 muertes al año son producidas por patógenos multirresistentes, cifra que se predice llegará a 10 millones para el 2050, si no se toman acciones oportunas (Boucher et al., 2017). En el Ecuador según datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC, 2017), la tercera y cuarta causa de morbilidad son las infecciones bacterianas, principalmente de origen respiratorio y gástrico. Al contrastar datos del 2014 con los de una década atrás, se observa que existe un aumento en el número de defunciones hospitalarias por causas de origen infeccioso, 1,24 por cada 1000 habitantes en el 2014 contra el 0,78 por cada 1000 habitantes en el 2004 (INEC, 2014).

3.2 ANTIBIÓTICOS Y MECANISMOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS

Los agentes antimicrobianos usados en la actualidad se clasifican de diversas maneras. La clasificación basada en su estructura química o molecular, los distribuye en: 1) β -lactámicos, 2) macrólidos, 3) aminoglucósidos, 4) quinolonas, 5) sulfamidas, 5) glicopéptidos, 6) oxazolidinonas, 7) estreptograminas y 8) tetraciclinas (Etebu y Arikekpar, 2016). Estos, a su vez, pueden clasificarse según su mecanismo de acción, en cinco categorías que incluyen: 1) inhibición de la síntesis de la pared celular, 2) ruptura de la membrana celular, 3) inhibición de la estructura y función de los ácidos nucleicos, 4) inhibición de la síntesis proteica y 5) bloqueo de vías metabólicas claves. (Tenover, 2006; Gualerzi, Brandi, Fabbretti y Pon, 2014; Hoerr et al., 2016; Karam et al., 2016). (Anexo 1)

En contraparte a esta variedad de mecanismos de acción antibiótica, las bacterias han desarrollado resistencia a una variedad de fármacos. Entre estos mecanismos están la resistencia mediante mutaciones y mediante transferencia horizontal de genes (Munita y Arias, 2016). El primer mecanismo se produce cuando un subconjunto de células bacterianas, desarrolla mutaciones genéticas que afectan la actividad de esta droga permitiendo que predomine la población bacteriana con la mutación. Estas mutaciones evitan la acción del antibiótico mediante diversos mecanismos como la modificación del sitio de acción del antibiótico, disminución del ingreso de la droga, activación de las bombas de eflujo para eliminar las moléculas dañinas y mediante alteración de vías metabólicas. El segundo mecanismo de resistencia se da mediante la adquisición de material genético foráneo mediante transformación, transducción y conjugación de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones o integrones, siendo esta última, la causa principal del desarrollo de resistencia antimicrobiana (Nikaido, 2009; Munita y Arias, 2016). Esta variedad de mecanismos de resistencia a antibióticos evidencia la urgente necesidad del desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

3.3 RESISTENCIA EN *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM) consta en la lista de alta prioridad para el desarrollo de antibióticos, publicada por la OMS en el 2017. Éste microorganismo es resistente a antibióticos β -lactámicos, como la meticilina y otros derivados de penicilinas, debido a la presencia de β -lactamasas y de los genes *mecA* y *mecC*, los cuales se encuentran asociados con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Goyal, Miller, Tripanthi y Parvizi, 2013; Milheirico, Lencastre y Tomasz, 2017). El SARM puede ser resistente a otros antibióticos como aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina, cloranfenicol y lincosamidas, por lo que se solía usar la vancomicina como medicamento de preferencia. Lastimosamente, en el 2002 se detectó la primera cepa resistente a vancomicina, a partir de esa fecha se ha reportado un incremento de aislados de *S. aureus* resistentes a vancomicina (SARV), lo que complica aún más su control (Centers for Disease Control and Prevention, 2002; Chew, Mahadi, Wong y Goh, 2018). En la actualidad, las infecciones con SARM se tratan inicialmente con vancomicina, en caso de que se detecte una resistencia a vancomicina se recomienda el uso de tedizolid, linezolid, quinupristin/dalfopristin, trimetoprim-sulfomidazol, telavancin o ceftarolina, o una combinación de estos, aunque en algunos casos los antibióticos actuales ya no son efectivos para controlar infecciones de estas cepas multirresistentes (Nikaido, 2009; Loomba, P.S., Taneja, J y Mishra, B., 2010; Zurita, 2012; Goyal, Miller, Tripanthi y Parvizi, 2013; Shenoy, 2014, Auwaerter, 2016, Beerbal, Panneer, Nambirajan, Rajan y Reshma, 2018).

Estudios realizados en Ecuador, reportan que el surgimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es cada vez más frecuente, siendo este el segundo patógeno aislado con mayor frecuencia (después de *E. coli*) de infecciones nosocomiales (Reyes et al., 2009; Zurita, 2012). Guerrero (2007) analizó la resistencia de 97 aislados de *S. aureus* de distintos hospitales de la ciudad de Quito, Ecuador, mediante la comparación del perfil plasmidial y la susceptibilidad registrada en los antibiogramas. Los aislados presentaron multirresistencia, distribuida de la siguiente manera: el 90% mostraron resistencia a penicilina, ampicilina y amoxicilina, 44% a tetraciclina, 38% resistencia a oxacilina (antibiótico similar a la meticilina) y cefalosporinas,

12% a macrólidos, 10% a eritromicina y 7,22% a clindamicina. A su vez Loaiza (2015) realizó el estudio de la dinámica clonal de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, en el cual el 100% de los aislados fueron resistente a cefoxitina, dentro de estos, el 72% tenían el gen SCCmec atípico (responsable de la resistencia a la meticilina).

3.4 METABOLITOS SECUNDARIOS COMO COMPUESTOS BIOACTIVOS

La necesidad de desarrollar nuevos agentes bioactivos más eficaces ha llevado a su búsqueda en nuevos nichos ecológicos (Selim, El-Beih, AbdEl-Rahman y El-Diwany, 2012). La investigación y desarrollo de nuevos fármacos, se atribuye a la diversidad de rutas metabólicas y biosintéticas ligadas a la biodiversidad. Entre estas moléculas bioactivas están principalmente los metabolitos secundarios (Corrado y Rodrigues, 2004).

Los metabolitos secundarios son un producto metabólico, no esencial para el organismo que lo produce, sintetizados a partir de uno o más metabolitos generales. Entre éstos metabolitos están los flavonoides, lignanos, terpenos, fenoles, alcaloides, esteroides, taninos, suberina, entre otros (Bruce y Palfreyman, 1998; Verpoorte y Alfermann, 2000).

Muchos estudios de este tipo se han enfocado en la investigación de compuestos bioactivos en hongos comúnmente encontrados en el ambiente, como hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, pero la tasa de descubrimiento de nuevos compuestos en este tipo de hongos ha disminuido drásticamente, lo que ha suscitado un creciente interés en la investigación de los metabolitos secundarios que producen los hongos endófitos (Corrado y Rodrigues, 2004).

3.5 HONGOS ENDÓFITOS UNA FUENTE PROMINENTE DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los hongos endófitos son un grupo taxonómico y ecológicamente heterogéneo, y representan uno de los simbioses de plantas más ubicuos de la tierra (Petrini, Sieber Toti y Viret, 1993; Oono, Lefèvre, Simha y Lutzoni, 2015).

Se los conoce por biosintetizar compuestos químicos similares a los de sus huéspedes, probablemente como una adaptación al medio en el que se encuentran, entre estos compuestos que producen y secretan están antibióticos, enzimas hidrolíticas, metabolitos (Martínez-Klimova, Rodríguez-Peña y Sánchez, 2016). Estos metabolitos secundarios poseen gran potencial antimicrobiano, antiparasitario, citotóxico, antiinflamatorio, antitumoral, antiparasitario, antioxidante y hasta actividad neuroprotectora (Malhadas et al., 2017).

Se han realizado varios estudios de la capacidad antibacteriana de los compuestos de hongos endófitos (Kyekyeku et al, 2017; Nair, Goveas, D'Souza, D'Cunha y D'Souza, 2017; Singh, Kumar, Singh y Pandey, 2017; Wu, Zhang, Zhang, Cheng y Zhang, 2018). Castillo et al. (2002) extrajo munumbicina A, B, C y D, un antibiótico con un amplio espectro antimicrobiano, del hongo endófito *Streptomyces* NRRL 3052; la munumbicina B mostró actividad contra una cepa de SARM, y en general entre los cuatro tipos de munumbicinas obtenidas se encontró actividad contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus anthracis* y *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente. Mitchell, Strobel, Moore, Robison y Sears (2010), demostraron la actividad antibiótica de los compuestos volátiles del hongo endófito *Muscodora crispans* contra varios patógenos humanos como *Yersinia pestis*, tres cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus*. Estos estudios exponen el potencial de los compuestos antimicrobianos de hongos endófitos.

3.6 EXTRACTOS DE LA COLECCIÓN DE ENDÓFITOS QUITO-CATÓLICA (CEQCA)

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, tiene en custodia alrededor de 5000 aislados de hongos endófitos en la Colección de Hongos Endófitos Quito-Católica (CEQCA). De esta colección se han obtenido extractos orgánicos con diferentes solventes, los mismos que han sido sometidos a varios tipos de bioensayos estandarizados. Veloz (2014), probó 34 extractos orgánicos y 11 extractos peptídicos de esta colección contra cinco bacterias ATCC® (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar

Enteritidis y *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*), de los cuales trece mostraron inhibición contra *S.aureus*, cinco contra *P. aeruginosa*, cuatro contra *E.coli*, siete contra *S. marcescens* y seis contra *S. entérica*.

3.7 JUSTIFICACIÓN

Los hongos endófitos tienen la capacidad de producir una diversidad de compuestos bioactivos con varias aplicaciones, como en la campo de la medicina. También se los considera como una fuente prominente de nuevas moléculas activas (Sánchez et al., 2013). Tomando en cuenta esto, y debido a la imperante necesidad de desarrollar nuevas fuentes antimicrobianas para frenar el precipitado aumento de organismos multirresistentes (Savi et al., 2015), el presente trabajo tiene como objetivo la bioprospección de la actividad antimicrobiana de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA), generando una buena base para futuros estudios en esta área, en especial del estudio de compuestos naturales que proporcionen una nueva alternativa para el control de una amplia gama de organismos patógenos.

3.8 OBJETIVOS

3.8.1.OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antibiótica de extractos orgánicos de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito-Católica CEQCA, sobre *Staphylococcus aureus*, con varios mecanismos de resistencia a antibióticos.

3.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar la bioactividad de extractos de hongos endófitos seleccionados de la base de datos de la colección CEQCA, que hayan mostrado capacidad bactericida o bacteriostática, ante cepas ATCC® de *Staphylococcus aureus*.

- Determinar la bioactividad de extractos de hongos endófitos de la colección CEQCA, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* con diferentes mecanismos de resistencia, mediante microdilución.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, de los extractos de hongos endófitos de la CEQCA, sobre veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes, provenientes de la Colección Bacteriana Quito-Católica (CB-QCA).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. SELECCIÓN DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS

Se seleccionaron 86 extractos de hongos endófitos provenientes de 33 hongos endófitos (Tabla 1) de la Colección de Endófitos Quito Católica – CEQCA, de los cuales treinta y cinco son extracciones con el solvente orgánico etil-Acetato (EA), treinta y tres con diclorometano (DCM) y dieciocho con metanol (MeOH). Veinte y siete de los 86 extractos fueron seleccionados con base en ensayos previos, en los cuales hubo actividad bactericida o bacteriostática contra cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923TM), cuyo detalle informativo consta en la base de datos de la colección CEQCA (Anexo 2), los 56 extractos restantes no tenían información previa sobre actividad antibiótica.

4.2. OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE HONGOS ENDÓFITOS

De los 86 extractos de hongos endófitos seleccionados, once no contaban con la cantidad de extracto necesaria para los ensayos. Por lo que se realizó nuevas extracciones de éstos.

Se colocaron once hongos endófitos, crioconservados a – 80 °C, en placas de agar papa dextrosa (PDA) (Harun et al., 2011) hasta obtener un cultivo axénico. Posteriormente, se transfirió el micelio a un medio líquido de caldo dextrosa y papa (PDB), en agitación constante para acelerar el crecimiento del hongo (Buatong et al., 2011).

4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS

Se obtuvo el extracto orgánico de once hongos endófitos mediante los protocolos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal Quito-Católica, basado en Bascom-Slack et al. (2012).

El hongo cultivado en PDB se separó en dos fases: fase líquida (PDB y metabolitos disueltos en el medio) y fase del micelio, usando gasas estériles como filtro. La fase micelial se colocó en un Erlemeyer con 400 mL de metanol (MeOH) y se lo mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas, luego de lo cual se volvió a filtrar con gasas para separar la fase líquida (MeOH con metabolitos disueltos en el medio) y la fase micelial, que se desechó.

La fase líquida se extrajo usando el solvente diclorometano (DCM) en relación 1:2, con agitación. Se recogió la fase del solvente y se realizó el mismo procedimiento con la fase del medio PDB restante usando el solvente etil acetato (EA) (Rodrigues et al., 2000; Rhoden, 2012).

Una vez terminada la extracción de metabolitos secundarios mediante solventes orgánicos, se procedió a concentrar los extractos obtenidos con tres solventes mediante evaporación, por rotavapor (Rotavapor® R-100), en viales de vidrio. Se registró el peso neto del extracto, el cual se resuspendió en 1 mL de MeOH, y se conservó a 4 °C.

Algunos hongos poseen varias extracciones con el mismo solvente, para distinguirlos, en el código de cada extracto, se coloca la inicial del solvente seguido por el número de extracción. Como por ejemplo el extracto CEQCA-CEQCA-O03215 E4 al ser la cuarta extracción con EA del endófito CEQCA-O03125.

4.4 SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Para los ensayos antibacterianos se seleccionó a *Staphylococcus aureus* (SA), con base en que está categorizado como patógeno que requiere estudios con urgencia alta según la OMS (2017) y debido a que en el Ecuador presenta alta resistencia a varios antibióticos.

Para verificar la bioactividad de los extractos, con registros en la CEQCA de actividad anti SA, se utilizaron bacterias *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™) en los ensayos preliminares.

En cuanto a las bacterias multirresistentes, se seleccionaron aislados bacterianos clínicos de *Staphylococcus aureus* de la Colección Bacteriana Quito-Católica (CB-QCA), con base en los perfiles de resistencia a antibióticos determinados por Guerrero (2007). Se trabajó con un total de veintidós aislados de *S. aureus* con seis distintos mecanismos de multirresistencia (Tabla 2).

4.5. PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO

Los perfiles fenotípicos de sensibilidad obtenidos mediante pruebas de difusión en disco con doce antibióticos fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Se verificaron dichos perfiles y se obtuvieron perfiles nuevos para dos antibióticos adicionales mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Para determinar la sensibilidad de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2015), se midieron los diámetros de los halos de inhibición (DHI).

4.6. BIOENSAYOS

4.6.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA *Staphylococcus aureus* ATCC®

Se evaluó la capacidad antibiótica de 86 extractos de hongos endófitos de la colección CEQCA (Tabla 1), mediante microdilución siguiendo los protocolos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), contra *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC® 25923™).

4.6.1.1 Procedimiento para ensayos de microdilución

Para realizar los ensayos de microdilución se siguió el protocolo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Se usaron 10 µL de cada extracto, más 90 µL de bacteria *Staphylococcus aureus* diluida en caldo Müller-Hinton (MHB) en proporción 1:200 de la escala de 0.5 de McFarland. Cada dilución (90 µL dilución de MHB y bacteria + 10 µL extracto) fue colocada en placas de microtitulación de poliestireno (COSTAR 3590) de 96 pocillos. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Todas las placas se incubaron a 35 °C por 18 horas, posterior a lo cual se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de placas de microtitulación iMark (Bio-Rad®) (Wiegand, Hilert y Hancock, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; Bascom-Slack et al., 2012).

4.6.1.2 Cálculos del porcentaje de Inhibición

Para determinar el porcentaje de inhibición se calculó la absorbancia de A y B, medido a las 16 horas, como consta en la siguiente ecuación

$$\% \text{Inhibición} = 100 - [(A * 100) / B] \quad (4.1)$$

Dónde:

A= absorbancia de las tres réplicas

B = absorbancia del control positivo

4.6.1.3 Controles

Cada placa constaba con un control positivo del crecimiento bacteriano (90 µL dilución de MHB y bacteria + 10 µL Metanol) y un control negativo (90 µL de MHB + 10 µL Metanol) (Figura 1) (Wiegand, Hilert y Hancock, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; Bascom-Slack et al., 2012).

Algunos extractos orgánicos poseen pigmentación la cual interfiere en el resultado, por lo cual, como control de color se usó 90 µL de MHB con 10 µL extracto en una placa extra, y se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de placas de microtitulación iMark (Bio-Rad®). Para el cálculo de la absorbancia en cada ensayo, se restó la absorbancia del color del extracto menos la absorbancia obtenida en cada ensayo.

4.6.1.4 Análisis estadísticos

Para analizar las diferencias de inhibición entre las veintidós bacterias multirresistentes se aplicó un Análisis de la Varianza (ANOVA unifactorial) y la prueba de Tukey en el programa SPSS (Versión 20). La significancia, se reportó con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

4.6.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES

Se evaluó la actividad antibiótica de 38 extractos, que presentaron actividad antibiótica en el ensayo contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), contra seis de las veintidós cepas proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas - PUCE, estas fueron: 102C-ORSA, 14-SAUR, 104C-ORSA, 70-SAUR, 8C-ORSA y 37C-ORSA (Tabla 2), se tomó estas seis cepas como representantes de cada mecanismo debido a la poca cantidad de los extractos. Se procedió como se detalla en los apartados 4.6.1.1 al 4.6.1.4.

4.6.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los diecinueve extractos que mostraron capacidad

bactericida y bacteriostática contra las seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes (Tabla 2).

Se obtuvieron diluciones seriadas en metanol, diluyendo cada extracto a la mitad de la concentración anterior, partiendo de la solución madre de cada extracto (Figura 2). Se procedió siguiendo los protocolos establecidos por el CLSI (Wiegand, Hilert y Hancock, 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012; Bascom-Slack et al., 2012), como se detalla en los apartados 4.6.1.1 al 4.6.1.4.

Para determinar la bioactividad, bactericida o bacteriostática, del extracto, se tomaron 10 µL de cada pocillo que presentó una absorbancia similar al control negativo y se los colocó en Placas Petri con agar Müller-Hinton. Se incubó a 35 °C durante 24 horas, y se verificó si hubo crecimiento (efecto bacteriostático) o no (efecto bactericida), siendo este dato la CMB (Figura 3).

4.6.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE MICRODILUCIÓN CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES

Para las dieciséis cepas restantes, se tomó la CMI de los extractos para cada uno de las seis cepas que se usó en el ensayo anterior, y se procedió siguiendo los protocolos establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), que se detallan en los apartados 4.6.1.1 al 4.6.1.4.

4.7 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) O LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Se evaluó la citotoxicidad de la CMI y CMB de dieciséis extractos usando 2mL de sangre humana (Anexo 3), se procedió de acuerdo al protocolo establecido por Karl Maramorosch y Hilary Koprowski (2014), en donde se

centrifugó la sangre hasta separar el plasma de los eritrocitos y se mezcló con PBS.

Se midió la absorbancia mediante espectrofotometría (iMark Bio-Rad®) a 570nm. Para calcular el porcentaje de hemólisis se tomaron los datos obtenidos después de la resta de color, y se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{hemólisis} = [(A-AO)/(AX-AO)] * 100 \quad (4.2)$$

(Donde: A es la lectura de absorbancia de la solución de extracto,

AO es la lectura de absorbancia del control negativo,

AX es la lectura de absorbancia del control positivo)

4.7.1 Controles

Algunos extractos orgánicos poseen pigmentación, la cual interfiere en los resultados; como control de color se usó, 50 µL de extracto diluido en PBS al 4%.

Se realizó un control positivo que corresponde al 100% de hemólisis (200 µL de eritrocitos humanos (RBC) al 4% + 195 µL de PBS/ 5 µL de Tritón 100X), y un control negativo, que corresponde al 0% de hemólisis (200 µL de RBC al 4% + 200 µL de PBS).

4.7.2 Análisis estadísticos

Para analizar las diferencias de hemólisis se aplicó un Análisis de la Varianza (ANOVA unifactorial) y la prueba de Tukey en el programa SPSS (Versión 20). La significancia se reportó con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

4.8 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Se extrajo ADN de seis hongos endófitos utilizando el protocolo sugerido por Bucheli et al. (2000) y Camacho et al. (1997) usando micelio joven y Chelex® 100 al 5%, el ADN se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop 2000®), se dividió en alícuotas y se almacenó a -20 °C.

4.8.1 Amplificación y secuenciamiento del ADN

Se amplificó la región ITS (Internal Transcribed Spacer, por sus siglas en inglés) del gen 5.8S ADNr usando los cebadores ITS1 e ITS4 para la amplificación y el posterior secuenciamiento (White et al., 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando las condiciones descritas por Bascom-Slack y colaboradores (2012). Posteriormente los amplicones fueron purificados y secuenciados en la empresa MACROGEN Inc.

Se obtuvo una secuencia consenso de cada muestra mediante el programa GAP4. Utilizando la herramienta BLASTn (Local Alignment Search Tool with nucleotide database) se comparó la secuencia consenso con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Koski y Goldin, 2001).

5. RESULTADOS

5.1 PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO

De los veintidós antibiogramas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas - PUCE, se obtuvieron nuevos perfiles de sensibilidad a catorce antibióticos. Estos fueron interpretados según el CLSI (2015).

Se observó una variación en cuanto a la sensibilidad presentada en algunas cepas, en comparación con los perfiles de sensibilidad proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas - PUCE (Tabla 3). Se constató la pérdida de resistencia a los siguientes antibióticos:

- Cefoxitina, en las cepas bacterianas 30C-ORSA y 32C-ORSA,
- Trimetoprim/sulfametoxazol, en la cepa 104C-ORSA,
- Oxacilina, en la cepa 58- SAUR,
- Tetraciclina, en las cepas 37C-ORSA y 30C-ORSA.

Además, se constató que más del 80% de cepas presentan resistencia a Penicilina, Ampicilina y Amoxicilina+ ác. clavulánico; mientras que ninguna cepa mostró resistencia a Trimetoprim/sulfametoxazol, vancomicina o netilmicina (Figura 4).

5.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™

De 86 extractos evaluados, cuarenta y uno inhibieron el crecimiento bacteriano de SA, veintidós tuvieron actividad bacteriostática y diecinueve actividad bactericida. Los extractos con actividad bacteriostática son aquellos que inhiben el crecimiento bacteriano sólo si el agente bacteriostático se encuentra en

el medio, mientras que los que poseen actividad bactericida son aquellos que provocan la muerte bacteriana.

De los veintisiete extractos que fueron evaluados en ensayos previos contra cepas de *S. aureus* ATCC® (Anexo 2), nueve extractos inhibieron a *S. aureus* ATCC® y dieciocho presentaron una pérdida en su bioactividad.

Los extractos del hongo CEQCA-P0688 presentaron actividad bactericida. El extracto CEQCA-P0688 D1 tuvo un porcentaje de inhibición del 75% y una segunda extracción del mismo hongo, el extracto CEQCA-P0688 D3, presentó un porcentaje de inhibición del 93%.

Cuatro extractos, CEQCA-P0688 E1, CEQCA-P5343 M3, CEQCA-P5343 D3 y CEQCA-O3215 E1 lograron una inhibición superior al 98%, con efecto bactericida en todos los casos.

El extracto CEQCA-O3215 E3, mostró actividad bactericida, mientras que la posterior extracción del mismo endófito, el extracto CEQCA-O3215 E4, sólo presentó actividad bacteriostática, un caso similar se da entre los extractos CEQCA-O0964 D1 y CEQCA-O0964 D2 o entre los extractos CEQCA-O0964 E2 y CEQCA-O0964 E3, igualmente con pérdida de bioactividad en la posterior extracción (Tabla 4).

Tres extractos, CEQCA-O3215 E3, CEQCA-O0964 D1, CEQCA-P5363 D3, presentaron bioactividad con porcentajes de inhibición del 100%, 93% y 85% respectivamente, pero no fueron tomados en cuenta para posteriores ensayos debido que se contaba con un bajo volumen de la muestra.

5.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES

Treinta y dos extractos de los treinta y ocho extractos evaluados presentaron actividad contra, al menos, dos de las seis cepas multirresistentes.

Diecinueve extractos inhibieron el crecimiento bacteriano con actividad bactericida o bacteriostática en las seis cepas muestreadas.

Cinco extractos, CEQCA-M0369 E1, CEQCA-O1111 E2, CEQCA-P0688 D3, CEQCA-P0628 E1, CEQCA-P0688 E3 y P0439 EA1/EA5 presentaron actividad bactericida contra las seis cepas multirresistentes (Tabla 5).

Treinta extractos inhibieron el crecimiento de la cepa 102C-ORSA, de los cuales doce presentaron actividad bactericida (Tabla 5). Destacándose los extractos CEQCA-O1111 D2, CEQCA-P5309 D1, CEQCA-O0628 E1 y CEQCA-P0688 E3 con un porcentaje de inhibición superior al 99%.

En la cepa 104C-ORSA, treinta y un extractos mostraron bioactividad, de los cuales seis presentaron actividad bactericida con un porcentaje de inhibición superior al 99%.

En la cepa 70-SAUR veintiocho extractos tuvieron bioactividad, doce con efecto bactericida y dieciséis con efecto bacteriostático.

Veintiocho extractos inhibieron el crecimiento de la cepa 14-SAUR, de los cuales la mitad presentó efecto bactericida y el otro 50% efecto bacteriostático, de estos, cinco extractos presentaron una inhibición del 100%.

Veinticinco extractos mostraron actividad antibiótica contra la cepa 37C-ORSA, de las cuales quince presentaron actividad bactericida.

En la cepa 8C-ORSA, catorce extractos mostraron efecto bacteriostático y diez efecto bactericida, de estos cuatro presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 99% (Tabla 5).

Cinco extractos, CEQCA-P0688 E1, CEQCA-P5343 D3, CEQCA-O1393 E2, CEQCA-P5227 D1 y CEQCA-P0439 EA1/EA5 presentaron bioactividad contra al menos cinco cepas multirresistentes, pero no fueron tomados en cuenta para posteriores ensayos debido que se contaba con un bajo volumen de la muestra.

5.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

La CMI y la CMB se determinaron a partir de absorbancias obtenidas de diecinueve extractos, que mostraron bioactividad contra al menos cinco cepas multirresistentes en su concentración cruda.

Quince extractos mantuvieron su capacidad inhibitoria contra al menos cinco cepas multirresistentes en alguna de sus diluciones, de los cuales el extracto CEQCA-P0688 D3 (1,03 µg/mL) tuvo actividad bactericida ante las seis cepas multirresistentes excepto en la cepa 37C-ORSA, en la cual tuvo efecto bactericida a una concentración de 2,07 µg/mL. Siendo este el extracto que logró inhibir a las seis cepas multirresistentes en la concentración más baja.

Se evidenció actividad bactericida y bacteriostática en diez extractos sobre las seis cepas muestreadas en las concentraciones que se detallan en la Tabla 6.

Los extractos CEQCA-P5343 M3 (32,06 µg/mL), CEQCA-O3215 D4 (10,6 µg/mL), CEQCA-P5309 D1 (21,1 µg/mL), CEQCA-P5227 M1 (328 µg/mL) tuvieron actividad bacteriostática con todas las bacterias representantes (Anexo 4).

Tres extractos, CEQCA-O0964 E2, CEQCA-P5309 D1 y CEQCA-P5343 M3 no fueron tomados en cuenta para posteriores ensayos debido que se contaba con un bajo volumen de la muestra.

5.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA MEDIANTE MICRODILUCIÓN SOBRE *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES.

Se probaron dieciséis extractos de hongos endófitos contra las dieciséis cepas multirresistentes que aún no habían sido ensayadas (Tabla 2).

Los extractos CEQCA-O1111 E2 (4 µg/mL), CEQCA-O1111 D2 (1,6 µg/mL) tuvieron una actividad bactericida o bacterioestática contra quince de las dieciséis cepas multirresistentes.

El extracto con la CMI más baja fue el CEQCA-O1111 D2 a una concentración de (1,6 µg/mL), el cual tuvo efecto bacterioestático ante catorce cepas, y efecto bactericida contra una cepa multirresistente.

Seis extractos CEQCA-M1320 E1 (20 µg/mL), CEQCA- P0688 E3 (8,6 µg/mL), CEQCA-P5227 M1 (656 µg/mL), CEQCA-P0688 D3 (2,07 µg/mL), CEQCA-O3215 D4 (21,2 µg/mL) y CEQCA-O0628 E1 (16,7 µg/mL) inhibieron el crecimiento de más del 50% de cepas multirresistentes (Tabla 7).

Dos extractos CEQCA-O3215 E4 (15,3 µg/mL), CEQCA-O0964 E4 (52,2 µg/mL), inhibieron sólo a cepas dentro de un mismo mecanismo de resistencia, correspondiente al de la cepa 70-SAUR, resistentes principalmente a tetraciclina.

El extracto CEQCA-P5175 E1 (22 µg/mL) inhibió a cepas dentro del mecanismo de la bacteria 102C-ORSA, resistente principalmente a quinolonas.

El extracto CEQCA-P5363 M1 (44,02 µg/mL) inhibió a cepas dentro del mecanismo de resistencia de la bacteria 37C-ORSA, resistente principalmente a betalactámicos.

Ocho extractos CEQCA-M0369 E1 (156,6 µg/mL), CEQCA-M0369 E1 (78,3 µg/mL), CEQCA-P0688 D1 (14,5 µg/mL), CEQCA-P0688 D1 (29,07 µg/mL), CEQCA-P5363 M1 (176,1 µg/mL), CEQCA-O0964 E4 (104,5 µg/mL), CEQCA-P5227 M1 (328 µg/mL) y CEQCA-P5309 (21,1 µg/mL) inhibieron a cepas correspondientes a dos tipos de mecanismos de resistencia. Los resultados obtenidos con las dieciséis bacterias multirresistentes se encuentran detallados en las Tabla 7.

5.6 EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) O LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Dieciocho extractos no tuvieron un porcentaje de hemólisis superior al 10%. En donde están incluidos extractos como el CEQCA-M0369 E1, CEQCA-P0688 D1, CEQCA-M1320 E1, CEQCA- O3215 D4, CEQCA-P0688 D3, CEQCA-P0688 E3, CEQCA-O3125 E4, CEQCA-O1111 D2, CEQCA-O0628 E1, CEQCA-P5227 M1 y CEQCA-O0964 E4.

Los extractos CEQCA-P5363 M1 (176,1 µg/mL, 44,02 µg/mL y 22,01 µg/mL), CEQCA-P5175 E1 (22 µg/mL) y CEQCA-P5175 D1 (15,05 µg/mL), presentaron porcentajes hemolíticos mayores al 40%.

Los extractos CEQCA-O1111 E2 (4,07 µg/mL) y CEQCA-O1111 D2 (3,3 µg/mL), inhibieron más del 95% de las veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes y presentaron porcentajes hemolíticos del 13,7% y 1,4% respectivamente (Tabla 8).

5.7 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Luego del proceso de extracción, purificación y secuenciamiento de seis hongos endófitos, se buscaron similitudes con otras secuencias dentro de la base de datos Basic Local Alignment Search Tool with nucleotide database (BLASTn) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Se determinó que dos hongos, CEQCA-P0212 y CEQCA-O0751, pertenecen a la familia Nectriaceae, y se los identificó dentro de los géneros *Ilyonectaria* y *Fusarium*, respectivamente. Los endófitos CEQCA-O0666, CEQCA-O0580 y CEQCA-O1096, pertenecen a los géneros *Neurospora*, *Xylaria* y *Diaporthe*, respectivamente. El endófito CEQCA-O0557 se identificó hasta el nivel de *Ascomycota*. Los datos de hongos identificados se encuentran detallados en la Tabla 9.

6. DISCUSIÓN

6.1. PERFILES FENOTÍPICOS DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO

El desarrollo de resistencia a múltiples antibióticos, representa una de las mayores amenazas para la salud humana en la actualidad (Savi et al., 2015). Esto se refleja en los perfiles fenotípicos de sensibilidad de cepas de *S. aureus* proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas - PUCE, detallados en la Tabla 3, en donde se constató que existe una amplia resistencia a varias clases de antibióticos por parte de dieciséis cepas de *Staphylococcus aureus*.

Al comparar estos perfiles fenotípicos, con los nuevos obtenidos en este estudio, se constató la pérdida de resistencia a cuatro antibióticos por parte de seis cepas de *Staphylococcus aureus*. En el estudio de Guerrero (2007) del perfil plasmidial de las cepas multirresistentes usadas en este estudio, se determinó que las cepas están provistas de uno a cuatro plásmidos que les proporcionan distintos mecanismos de resistencia; la ausencia de estos plásmidos en la población implicaba, en su mayoría, una reducción de dicha resistencia. La pérdida de resistencia de estas seis cepas puede deberse a que estos plásmidos comprendían un alto costo en su aptitud biológica y la ausencia de presión selectiva, provista por dichos antibióticos, favoreció esta pérdida plasmidial (Anderson y Hughes, 2011). Se ha observado que la estabilidad plasmidial varía particularmente en ausencia de la selección biológica, como es el caso de bacterias *in vitro*, y depende mucho de las cepas con las que se esté trabajando, ya que cada una posee una dinámica plasmidial única (Ponciano, Gelder, Top y Joyce, 2007).

La amplia resistencia a antibióticos como la Ampicilina, Penicilina y Amoxicilina, por parte de más del 80% de las cepas de *S. aureus*; y la susceptibilidad de todas las cepas ante los antibióticos vancomicina, netilmicina y trimetoprim/sulfametoxol, corresponden a los perfiles de susceptibilidad obtenidos por Guerrero (2007), posiblemente siendo estos los clones más

prevalentes en centros hospitalarios de los cuales se colectó las muestras en los cuatro años que duró su estudio. La resistencia de las cepas elegidas para el estudio también está asociada a que *Staphylococcus aureus* metil-resistente (SARM), comúnmente presenta resistencia a meticilina y a derivados betalactámicos, como la ampicilina, penicilina y amoxicilina; este tipo de resistencia es más frecuente en cepas de origen hospitalario (Fernández, Trueba, Toledo y Casal, 2015; Abente et al., 2016).

6.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™

La resistencia a distintos antibióticos ha vuelto indispensable el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para solucionar esta problemática (Malhadas, Malheiro, Pereira, de Pinho y Baptista, 2017). Al comprobar el potencial antimicrobiano de 86 extractos de hongos endófitos, cuarenta y un extractos poseen bioactividad contra *S. aureus* ATCC®, de los cuales diecinueve presentaron actividad bacteriostática, haciendo de estos extractos los más promisorios para los ensayos contra las cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes, en especial del hongo *Fusarium oxysporum* (CEQCA-P0688), el cual fue el endófito que mayor bioactividad presentó en sus cuatro extracciones, dos con DCM y dos con EA, lo que podría estar asociado a la presencia de uno o varios compuestos con efecto tóxico para esta bacteria.

Se constató la pérdida total en la bioactividad de diecinueve extractos que mostraron actividad antimicrobiana en ensayos anteriores. La pérdida de bioactividad puede estar relacionada a la composición química de sus metabolitos secundarios, la cual, pudo proveerlos de una menor estabilidad intrínseca (Baertschi y Jansen, 2005). Todos los compuestos o moléculas poseen su propio orden cinético de degradación el cual puede darse por reacciones de hidrólisis, redox, fotólisis y reacciones de rasemización (Baertschi y Alsante, 2005); estos procesos de degradación se encuentran directamente influenciados por parámetros del medio como la luz, temperatura, humedad y pH, los cuales

podieron variar al momento de su conservación y posterior uso (Frisvad, Andersen y Thrane, 2007, Lachman y Liberman, 2014).

Los hongos endófitos CEQCA-O3215 y CEQCA-O0964 presentaron una pérdida de bioactividad en sus posteriores extracciones con el mismo solvente, esta variación en la bioactividad puede ser una señal de una reducida producción de metabolitos secundarios debido a una variación en sus parámetros de cultivo, como son el medio de cultivo, aireación, fase del crecimiento, pH, y la luz (Hardoim et al., 2015; Frisvad, Andersen y Thrane, 2007; Aly, Debbab y Proksch, 2011). El cultivo continuo de los endófitos para la extracción de sus metabolitos ha mostrado ser uno de los responsables de la reducción o pérdida total de la capacidad de producir dichos compuestos bioactivos (Pu et al., 2013). En futuras extracciones se podría cultivar los hongos en medios más complejos con sacarosa, glucosa, en conjunto con extracto de levadura y de malta, minerales adicionales y trazas de metales, que han demostrado aumentar la diversidad química y mayor concentración de los compuestos de hongos endófitos (Hardoim et al., 2015; Frisvad, Andersen y Thrane, 2007; Aly, Debbab y Proksch, 2011). También se podría observar si existe una variación en la producción de metabolitos en medios como el agar dicloro sacarosa-extracto de levadura-Rosa Bengala (DRYES) y agar extracto de levadura_sacarasa (YES), los cuales en conjunto con el medio agar papa-dextrosa (PDA), usado en este estudio, han demostrado ser ideales como soporte para la producción de metabolitos secundarios de hongos filamentosos (Frisvad, Andersen y Thrane, 2007).

La pérdida de bioactividad de los metabolitos secundarios expone la necesidad de un mejor entendimiento en la relación endófito-huésped a un nivel molecular y genético, de su regulación genética, y los efectos de cambios en el ambiente y condiciones del cultivo en la expresión de ciertos genes, permitiendo optimizar la producción de metabolitos secundarios por parte de hongos endófitos cultivados en laboratorio, dando lugar a una producción eficiente de drogas con gran potencial bioactivo (Aly, Debbab y Proksch, 2011).

6.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE EXTRACTOS DE HONGOS ENDÓFITOS CONTRA *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES

Mediante ensayos de microdilución se determinó la bioactividad de los extractos contra veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Se eligió este método, para todos los ensayos, ya que proporciona resultados cuantitativos de la actividad antimicrobiana, permite encontrar las CMI y CMBs, a más de proveer información adicional como el efecto bactericida o bacteriostático del extracto (Sánchez, Castillo y García, 2016).

Al probar estos 41 extractos contra cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes, diecinueve mostraron capacidad antibacterial, quince de estos hongos poseen ensayos similares sobre la bioactividad de sus compuestos contra varios patógenos, la mayoría de estos estudios se realizan con cepas bacterianas ATCC® (Ratnaweera, Williams, Silva, Wijesundera, Dalisay y Andersen, 2014; Zhou et al, 2015; Hussain et al., 2015; Lin, Yu, Lin y Zhang, 2016; Sousa et al., 2016; Malhadas, Malheiro, Pereira, Pinho y Baptista, 2017); el presente ensayo evaluó la capacidad inhibitoria de hongos endófitos contra cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes, lo que los hace de gran utilidad ante la prevalente resistencia antimicrobiana a distintos agentes microbianos (Malhadas, Malheiro, Pereira, de Pinho y Baptista, 2017).

Dieciséis extractos en sus distintas diluciones mostraron bioactividad contra al menos nueve cepas multirresistentes, siendo los extractos CEQCA-O1111 E2 (4 µg/mL) y CEQCA-O1111 D2 (1,6 µg/mL) los que mayor bioactividad presentaron en las CMI más bajas, inhibiendo veintiún cepas de *S. aureus* multirresistentes. Este trabajo presenta una buena base para estudios posteriores en cuanto a la purificación e identificación de sus compuestos o moléculas activas, las cuales podrían ser de gran interés para estudios contra otros patógenos, debido al alto porcentaje de inhibición presentado ante varios mecanismos de resistencia en *S. aureus*.

Cinco extractos mostraron una prominente bioactividad, inhibiendo a más del 50% de las cepas ensayadas, esto podría ser un indicativo de que estos hongos poseen una variedad de compuestos o moléculas bioactivas con un amplio espectro de acción ante varios mecanismos de resistencia, exponiendo la importancia de los hongos endófitos por su capacidad de producir una variedad de compuestos bioactivos naturales (Narth y Joshi, 2014; Passari, Mishra, Saikia, Gupta y Singh, 2015).

En contraparte a estos hongos que producen compuestos con bioactividad ante cepas con diversos mecanismos de resistencia, cuatro extractos tuvieron una actividad más específica, en los cuales inhibieron a cepas resistentes a tetraciclinas (CEQCA-O3215 E4 y CEQCA-O0964 E4), quinolonas (CEQCA-P5175 E1) y betalactámicos (CEQCA-P5363). Los compuestos de estos hongos podrían ser una nueva opción para combatir la resistencia a estos grupos de antibióticos en diversas bacterias; en especial los compuestos que podrían purificarse del hongo CEQCA-P5363, debido a la creciente resistencia a betalactámicos por parte de bacterias Gram Positivas y Gram Negativas (Abraca y Herrera, 2001; García Castellanos, Castillo Marshal y Salazar Rodríguez, 2014).

Existen varios estudios relacionados a la variedad de compuestos obtenidos de hongos endófitos, entre los que destacan los de *Fusarium oxysporum* (CEQCA-P0688), el cual mostró una prominente bioactividad contra *S. aureus* ATCC®, y fue el segundo hongo con mayor bioactividad contra cepas multirresistentes. Este hongo al ser ubicuo posee una diversidad de estudios, de los cuales se ha logrado identificar una variedad de compuestos con gran actividad ante bacterias y hongos patogénicos humanos (Takken y Rep, 2010; Giannakopoulou et al., 2015; Di, Gomila y Takken, 2017; Nasr, Abdel-ghany, Mousa, Alasmaey y Atalla 2018). Cabe recalcar que se han identificado compuestos con potencial anticancerígeno y antifúngico como el Ergosterol, el cual parece ser un compuesto comúnmente producido por ese hongo (Starratt y Madhosingh, 1967; Montgomery, Monreal, Young y Seifert, 2000; Zuo, Zhang, Chen, Chen y Huang, 2017; Nasr et al., 2018).

Estudios en hongos endófitos ecuatorianos contra *Staphylococcus aureus* ATCC® (Forcina et al., 2015) han identificado compuestos con actividad antimicrobial leve y moderada por parte de compuestos nuevos como los Stelliosphaeroles A y B, los cuales fueron extraídos de un nuevo endófito (*Steroplliosphaera formicum*). Todos estos estudios en especial los realizados en el Ecuador, en conjunto con el presente estudio muestran el gran potencial antimicrobiano de los hongos endófitos, los cuales también podrían ser fuente de compuestos antiparasitarios, citotóxicos, antiinflamatorios, antitumorales, antiparasitarios, antioxidantes y hasta con actividad neuroprotectora (Malhadas et al., 2017).

Cinco hongos no poseen investigaciones previas publicadas sobre su bioactividad en bacterias u otros patógenos, entre los cuales constan *Xylaria acuta* (CEQCA-P0439), *Diaphorthe brasiliensis* (CEQCA-P5202), *Hypoxyton subrutiloides* (CEQCA-P5342), *Muscodor vitigmus* (CEQCA-M1291) y *Elsinoe eelemani* (CEQCA-P5227), siendo éste estudio el primero en reportar su bioactividad antimicrobiana.

6.4. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD SEGÚN EL GRADO DE HEMÓLISIS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

El test de hemólisis se llevó a cabo ya que es posible que compuestos que presentan una gran actividad biológica no sean útiles para el desarrollo de antibióticos o su uso en seres vivos, si presentan un alto efecto hemolítico (Zohra y Fawzia, 2014). Lo que sugiere que los diecinueve extractos que no presentaron un porcentaje hemolítico superior al 10%, pueden ser usados posteriormente en ensayos in vivo. Cabe recalcar, que el porcentaje obtenido de estos diecinueve extractos, se encuentra dentro del porcentaje admisible para compuestos naturales (Martínez et al., 2013).

La actividad hemolítica de cada extracto se relaciona con su composición química, lo que indica que es posible que extractos que poseen un porcentaje elevado de hemólisis tengan moléculas altamente citotóxicas, pero al no ser

compuestos purificados, estos compuestos citotóxicos no necesariamente podrían estar relacionados a los compuestos activos de los extractos. También al tener un mayor conocimiento de la estructura y función de los compuestos o moléculas activas, estas podrían ser modificadas en cuanto a sus propiedades toxicológicas o podrían usarse vectores que se unan a receptores, o que posean moléculas de adhesión específicas para el fin requerido, evitando o aliviando los efectos adversos de estas moléculas o compuestos activos (Juillerat-Jeanneret y Schmitt, 2007; Guo, 2017).

6.5. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA MOLECULAR DE LOS HONGOS ENDÓFITOS

Los hongos seleccionados e identificados en este estudio pertenecen, en su totalidad, a la división *Ascomycota* (Tabla 1). Esta dominancia se debe a que estos hongos endófitos, en conjunto con los *Glomeromycota* y *Basidiomycota* son aislados con más frecuencia que otros hongos (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, 2014), y son fácilmente cultivados bajo condiciones controladas de laboratorio (Frisvad, Andersen y Thrane, 2007).

Dentro de los hongos aislados con mayor facilidad dentro de la división *Ascomycota*, están los de la clase *Dothideomycetes*, seguido por miembros de la clase *Sordariomycete*, a la que pertenecen un gran número de hongos usados e identificados en este estudio, como lo son *Xylaria*, *Fusarium*, *Diaporthe*, *Illyonectaria* y *Neurospora* (Hardoim et al., 2015), como se observa en la Tabla 1 y Tabla 9.

Al comparar la secuencia consenso del hongo CEQCA-O0557 en la base de datos del NCBI usando la herramienta BLASTn, fue identificado hasta la división *Ascomycota*, al igual que el hongo CEQCA-O1111. Es necesaria identificación taxonómica más precisa de esos hongos a nivel de género y especie, para determinar si estos hongos son posibles nuevas especies, ya que poseen moléculas o compuestos bioactivos de interés.

En el presente estudio, la actividad antibiótica de 86 extractos provenientes de 33 hongos endófitos, reveló una significativa capacidad inhibitoria en contra de cepas de *S. aureus* multiresistentes. El hongo con mayor capacidad antibiótica fue el CEQCA-O1111, el cual logró inhibir a las veintiuna cepas multiresistentes, seguida por seis hongos que inhibieron a más del 50% de las cepas multiresistentes. Por lo que, esta investigación sugiere que los hongos endófitos tienen una gran capacidad de producir metabolitos secundarios con una gran capacidad antibiótica contra cepas de *S. aureus*, y potencialmente contra otros patógenos de interés (Fouda, Hassan, Eid y Ewas, 2015). Los estudios de endófitos para propósitos farmacéuticos y biotecnológicos son fundamentales para descubrir nuevas sustancias para fines terapéuticos como antibióticos, antimicóticos y anticancerígenos, por lo que una identificación y estudio de las propiedades de estos metabolitos secundarios podría llevar al descubrimiento de una valiosa fuente de estas nuevas sustancias con diversos fines terapéuticos (Fouda, Hassan, Eid y Ewas, 2015).

7. CONCLUSIONES

1. Los hongos endófitos pueden constituir un recurso de interés para el descubrimiento de antibióticos.
2. Se detectó actividad antibiótica en el 48% de extractos de hongos endófitos en ensayos contra *S.aureus* ATCC® 25923, y en el 44% de extractos de hongos endófitos en ensayos contra cepas de *S. aureus* multiresistentes.
3. Los extractos orgánicos de hongos endófitos ensayados mostraron bioactividad contra seis mecanismos de resistencia:
 1. Resistencia a betalactámicos
 2. Resistencia a cefalosporinas
 3. Resistencia a tetraciclinas
 4. Resistencia a quinolonas
 5. Resistencia a sulfonamidas
 6. Resistencia a macrólidos
4. Los niveles de hemólisis, como prueba de citotoxicidad, fueron bajos para la mayoría de extractos probados.
5. Los CMI y CMB fueron variables, la mayoría de ellos bajos.
6. Los extractos orgánicos de los hongos endófitos CEQCA-O1111 y CEQCA-P0688 (*Fusarium oxysporum*) son promisorios para realizar una caracterización posterior para la determinar las biomoléculas responsables de la actividad antibacteriana; considerando que estos inhibieron el 95% de las cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes a bajas concentraciones.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abente, S., Carpinelli, L., Guillén, R., Rodríguez, F., Fariña, N., Laspina, F. y López, Y. (2016). Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 14(2), 8-1. doi: 10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(02) 08-016.
- Abraca, G. y Herrera, M.L. (2001). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*, 36, 1-2
- Aly, A.H., Debbab, A y Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829-1845. doi: 10.1007/s00253-011-3270-y
- Andersson, D. I. y Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 901-911. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x
- Armas-Fernández, A., Suárez-Trueba, B., Crespo-Toledo, N., y Suárez-Casal, A. (2015). Gaceta Médica Espirituana. *Gaceta Médica Espirituana*, 17(3), 80-91. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1608-89212015000300011
- Auwaerter, P.G. (2016). *Staphylococcus aureus*. Johns Hopkins Medicine-POC-IT Guides. Recuperado de https://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540518/all/Staphylococcus_aureus
- Baertschi, S.W. y Alasante, K.M. (2005). *Stress Testing: A predictive Tool, Pharmaceutical Stress Testing (Predicting Drug Degradation)*. Segunda Edición. Londres. CRC Press.

- Baertschi, S.W. y Jansen, J.P. (2005). *Stress Testing: A predictive Tool, Pharmaceutical Stress Testing (Predicting Drug Degradation)*. Taylor & Francis Group, LLC.
- Bascom-Slack C, Arnold A, Strobel S. (2012). Student-directed discovery of the microbiome and its products. *Science* 338 (6106), 485-486.
- Bascom-Slack, C. A., Arnold, A. E., y Strobel, S. A. (2012). Supplementary Materials for Student-Directed Discovery of the Plant Microbiome and Its Products. *Science*, 338(485),1-67.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.
- Beerbal, K.B., Panneer, S.K., Nambirajan, G., Rajan, S. y Reshma, A. (2018). REGIONAL OCCURRENCE, ANTIBIOGRAM- RESISTOGRAM AND VIRULENCE PATTERNS OF CARRIER - DERIVED VANCOMYCIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (VRSA). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(10), 1013-1018.
- Boucher, H. W., Ambrose, P. G., Chambers, H. F., Ebright, R. H., Jezek, A., Murray, B. E., . . . Rex, J. H. (2017). White Paper: Developing Antimicrobial Drugs for Resistant Pathogens, Narrow-Spectrum Indications, and Unmet Needs. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(2), 228-236. doi:10.1093/infdis/jix211
- Bruce, A., y Palfreyman, J. W. (1998). *Forest products biotechnology*. London. Taylor y Francis.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. y Sakayaroj, J.. (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 27, 3005–3008.

- Bucheli, E., Gautschi, B. y Shykoff, A. (2000). Host specific differentiation in the anther smut fungus *Mycrotryum violaceum* as revealed by microsatellites. *J Evol Biol*, 13,188-198.
- Camacho, F.J., Gernandt, D.S., Liston, A., Stone, J.K. y Klein, A.S. (1997). Endophytic fungal DNA, the source of contamination in spruce needle DNA. *Molecular Ecology*, 6, 983-987.
- Castillo, U.F., Strobel, G.A., Ford, E.J., Hess, W.M., Porter, H. Jensen, J.B., Albert, H., Robinson, R., Condron, M.A.M., Teplow., Stevens. D. y Yever, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*, *Microbiology*, 148(9), 2675-2685.
- Chew, Y.L., Mahadi, A.M., Wong, K.M. y Goh, J.K. (2018). Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. And their mechanism of antibacterial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(70),1-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically*. Approved standard – ninth edition. CSLI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). Performance standards for 210 antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement M100-S26. 211 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Control for Disease Control and Prevention. (2002). Vancomycin-resistant *Staphylococcus Aureus*--Pennsylvania, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly*, 51(40),902. Recuperado de <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5140a3.htm>

- Corrado, M., y Rodrigues, K. F. (2004). Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2), 157-160. doi:10.1002/jobm.200310341
- Di, X., Gomila, J. y Takken, J.L.W. (2017). Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling pathways in the susceptibility of tomato to *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 18(7), 1024-1035. doi: 10.1111/mpp.12559
- Etebu, E. y Arikekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4,90-101. Recuperado de http://www.bluepenjournals.org/ijambr/pdf/2016/October/Etebu_and_Arikekpar.pdf
- Forcina, Giovanni C., Castro, Amaya, Bokesch, Heidi R., Spakowicz, Daniel J., Legaspi, Michelle E., Kucera, Kaury, ... Strobel, Scott A. (2015). Stelliosphaerols A and B, Sesquiterpene-Polyol Conjugates from an Ecuadorian Fungal Endophyte. *Journal of Natural Products*, 78(12), 3005-3010. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00749
- Fouda, A.H., Hassan S.E-D, Eid, A.M y Ewas, E.E.D. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60 (1), 95-104. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2015.04.001>
- Freire-Moran, L., Aronsson, B., Manz, C., Gyssens, I. C., So, A. D., Monnet, D. L., y Cars, O. (2011). Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—Time to react is now. *Drug Resistance Updates*, 14(2), 118-124. doi:10.1016/j.drug.2011.02.003
- Frisvad, J.C., Andersen, B. y Thrane. U. (2007). The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological Research* 112(2), 231-240. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.08.018>

- García Castellanos, T., Castillo Marshal, A. y Salazar Rodríguez, D. (2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(1).
- Giannakopoulou, A., Steele, J. F. C., Segretin, M. E., Bozkurt, T. O., Zhou, J., Robatzek, S.,... Kamoun, S. (2015). Tomato I2 immune receptor can be engineered to confer partial resistance to the oomycete *Phytophthora infestans* in addition to the fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 28(12), 1316–1329. doi: 10.1094/MPMI-07-15-0147-R
- Goyal, N., Miller, A., Tripathi, M. y Parvizi, J. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *The Bone and Joint Journal*, 95(B), 4-9. doi:10.1036/1097-8542.br0609161
- Gualerzi, C. O., Brandi, L., Fabbretti, A. y Pon, C. (2014). *Antibiotics targets, mechanisms and resistance*. Weinheim: Wiley-VCH-Verl.
- Guerrero S. (2007). Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* y su relación con el perfil plasmidial. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Guo, Zongru. (2017). The modification of natural products for medical use. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(2), 119-136. doi:10.1016/j.apsb.2016.06.003
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. y Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology*, 79(3), 293-320. doi:10.1128/MMBR.00050-14.
- Harun, A., James R., Lim S., Majeed A., Cole A.L. y Ramasamy K. (2011). BACE1 inhibitory activity of fungal endophytic extracts from Malaysian medicinal plants. *BMC Complement. Altern. Med*, 11(79).
- Hoerr, V., Duggan, G. E., Zbytnuik, L., Poon, K. K., Große, C., Neugebauer, U., . . . Vogel, H. J. (2016). Characterization and prediction of the mechanism of

action of antibiotics through NMR metabolomics. *BMC Microbiology*, 16(1). doi:10.1186/s12866-016-0696-5

Hussain, H., Drogies, K. H., Al-Harrasi, A., Hassan, Z., Shah, A., Rana, U. A., ... Krohn, K. (2015). Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium sp.* *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(3), 186-189. doi:10.1016/S2222-1808(14)60650-2

Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2014). Compendio estadístico 2014, Retrieved September 27, 2017, from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/>

Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2017). Anuario de Estadísticas Vitales: Nacimientos y Defunciones 2017. Retrieved Julio 15, 2018, from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/nacimientos_y_defunciones/

Juillerat-Jeanneret, L., y Schmitt, F. (2007). Chemical modification of therapeutic drugs or drug vector systems to achieve targeted therapy: Looking for the grail. *Medicinal Research Reviews*, 27(4), 574-590. doi:10.1002/med.20086

Selim K.A., El-beih A.A., Abdel-rahman T.M. y El-diwany A.I. (2012). Biology of Endophytic Fungi. *Current Research in Enviromental & Applied Mycology*, 2(1) 31-82. doi:10.5943/cream/2/1/3

Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H., y Vincent, J. (2016). Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, 20(1). doi:10.1186/s13054-016-1320-7

Koski L.B. y Golding G.B. (2001). The closset BLAST hit is often not the nearest neighbor. *J. Mol. Evol.* 52, 540-542.

Kyekyeku, J. O., Kusari, S., Adosraku, R. K., Bullach, A., Golz, C., Strohmam, C. y Spiteller, M. (2017). Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Fusarium solani* JK10. *Fitoterapia*, 119, 108–114. doi:10.1016/j.fitote.2017.04.007

- Lachman y Lieberman. (2014). *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, New Delhi: CBS Publishers & Distributors Pvt. Ltd.
- Lin, X., Yu, M., Lin, T. y Zhang, L. (2016). Secondary metabolites of *Xylaria* sp., an endophytic fungus from *Taxus mairei*. *Natural Product Research*, 30(21), 2442–2447. doi:10.1080/14786419.2016.1198350
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- Loaiza K. (2015). Dos Años De Vigilancia De La Dinámica Clonal de *Staphylococcus aureus* Resistente A Meticilina Aislados De Un Hospital De Tercer Nivel En Quito-Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Loomba, P.S., Taneja, J. y Mishra, B. (2010). Methicillin and Vancomycin Resistant *S. aureus* in Hospitalized Patients. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2 (3), 275-283. doi: 10.4103/0974-777X.68535
- Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J.A., de Pinho, P. y Baptista, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 46. Doi: 10.1007/s11274-017-2216-7
- Maramorosch K. y Koprowski, H. (2014). *Methods in Virology*. Volume 5. New York. ACADEMIC PRESS.
- Martínez, M., Manucuello, C., Pereira, C., González, F.,... Benítez B. (2013). Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. *Steviana* (5),114-121.

- Martinez-Klimova, E., Rodriguez-Peña, K. y Sánchez S. (2016). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*, 134, 1-17. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.010>
- Milheiriço, C., Lencastre, H. y Tomasz, A. (2017). Full-Genome Sequencing Identifies in the Genetic Background Several Determinants That Modulate the Resistance Phenotype in Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Carrying the Novel *mecC* Gene. *American Society for Microbiology*, 61(3), 1-9.
- Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Moore, E., Robinson, R. y Sears, J. (2010). Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 156(1), 270-277. doi: 10.1099/mic.0.032540-0
- Montgomery, H. J., Monreal, C. M., Young, J. C. y Seifert, K. A. (2000). Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), 1207-1217. doi:10.1016/S0038-0717(00)00037-7
- Munita, J. M. y Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, 4(2), 481-511. doi:10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015
- Nair, A.C., Goevas, S. D'Souza, L., D'Cunha, F. y D'Souza, V. (2017). Antibacterial and antioxidant potential of organic solvents extract of mangrove endophytic fungus *Eupenicillium senticosum* Scott. *Journal of Alternative Medicine Research*, 9(1), 65-73.
- Narth, A. y Joshi, S.R. (2014). Ultrastructural effect on mastitis pathogens by extract of endophytic fungi associated with ethnoveterinary plant, *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(1), 38-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.10.001>.
- Nasr, H.M.D., Abdel-ghany, R.O., Mousa, S.A.S, Alasmaey, M. y Atalla, A.A. (2018). Biological Activity of Crude Extracts of Endophytic *Fusarium Oxysporum* and its Chemical Composition by Gas Chromatography–Mass

Spectrometry. *Elixir*, 117, 5065-5068. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Mostafa_Alasmaey3/publication/324844209_Biological_Activity_of_Crude_Extracts_of_Endophytic_Fusarium_Oxysporum_and_its_Chemical_Composition_by_Gas_Chromatography-Mass_Spectrometry/links/5ae7580eaca2725dabb2a43b/Biological-Activity-of-Crude-Extracts-of-Endophytic-Fusarium-Oxysporum-and-its-Chemical-Composition-by-Gas-Chromatography-Mass-Spectrometry.pdf

Nath, A. y Joshi, S. R. (2015). Ultrastructural effect on mastitis pathogens by extract of endophytic fungi associated with ethnoveterinary plant, *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(1), 38-43. doi:10.1016/j.jmau.2014.10.001

Nikaido, H. (2009). Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of biochemistry*, 78(1), 119-146. doi:10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923

Oono, R., Lefèvre, E., Simha, A. y Lutzoni, F. (2015). A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology*, 119(10), 917-928. doi:10.1016/j.funbio.2015.07.003

Organización Mundial de la Salud. (2017). El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>

Passari, A.K., Mishra, V.K., Saikia, R., Gupta, V.K. y Singh, B.P. (2015). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 273-286. doi: 10.3389/fmicb.2015.00273

Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L. y Viret, O. (1993). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3), 185-196. doi:10.1002/nt.2620010306

- Ponciano, J.M., De Gelder, L., Top, A.M. y Joyce, P. (2007). The Population Biology of Bacterial Plasmids: A Hidden Markov Model Approach. *Genetics*, 176(2), 975-968. doi: 10.1534/genetics.106.061937.
- Pu, X., Qu, X., Chen, F., Bao, J., Zhang, G. y Luo, Y. (2013). Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: Isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9365-9375. doi:10.1007/s00253-013-5163-8
- Ratnaweera, P. B., Williams, D. E., de Silva, E. D., Wijesundera, R. L. C., Dalisay, D. S. y Andersen, R. J. (2014). Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. *Mycology*, 5(1), 23–28. doi:10.1080/21501203.2014.892905
- Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Panesso, D., Conatretas, G.A., Zurita, J., Carillo, C., ... Arias, C.A. (2009). Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 Sequence Type 8 Linage in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, 49 (12). doi.org/10.1086/648426
- Rhoden S.A., Garcia, A., Bongiorno, V.A., Azevedo J.L. y Pamphile J.A. (2012). Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Trichilia elegans* A. Juss. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 02(32) 57–59.
- Rodrigues, K.F., Hesse M. y Werner C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *J. Basic Microbiol.*, 40, 261–267.
- Sánchez-Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C. y Macías-Rubalcava, M. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 132-146. doi:10.1016/S1405-888X(13)72084-9

- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L. y García-Palencia, P. (2016). Actividad Antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*, 77-100. doi:10.3926/oms.334
- Savi, D.C., Haminiuk, C.W.I., Sora G.T.S., Adamoski, D.M., Kenski, J., Winnischofer, S.M.B. y Glienke, C. (2015). Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic Actinomycetes isolated from *Vochysia divergens*. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 5(1), 347-356. Recuperado de <http://www.ijpcbs.com/files/volume5-1-2015/43.pdf>
- Shamsuzzaman, S.M. (2015). Multidrug-resistant, Extensively drug-resistant and Pandrug-resistant bacteria and antimicrobial therapy in combination. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, 9(2), 1-2. Rescuperado de <https://www.banglajol.info/index.php/BJMM/article/viewFile/31348/21089>.
- Shenoy, E. S., Paras, M. L., Noubary, F., Walensky, R. P. y Hooper, D. C. (2014). Natural history of colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant Enterococcus(VRE): a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). doi:10.1186/1471-2334-14-177
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R. y Pandey, K. D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. 3 *Biotech*, 7(5). doi:10.1007/s13205-017-0942-z
- Sousa, J. P. B., Aguilar-Pérez, M. M., Arnold, A. E., Rios, N., Coley, P. D., Kursar, T. A. y Cubilla-Rios, L. (2016). Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1501–1508. doi:10.1111/jam.13132
- Starratt, A. N. y Madhosingh, C. (1967). STEROL AND FATTY ACID COMPONENTS OF MYCELIUM OF *Fusarium Oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 13(10), 1351–1355. doi:10.1139/m67-181

- Strobel, G. y Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. y Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268. doi: 10.1021/np030397v.
- Takken, F. y Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 11(2), 309-314. doi: : 10.1111/J.1364-3703.2009.00605.X
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6). doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011
- Veloz, E. (2014). Evaluación de la capacidad antibiótica y antifúngica de extractos orgánicos y peptídicos de hongos endófitos provenientes de la Colección de Endófitos Quito-Católica (CEQCA). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Verpoorte, R. y Alfermann, A. W. (2000). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Netherlands: Kluwer Academic.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J.W. (1990). PCR Protocols: guide to methods and applications: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. USA: Press Inc New York.
- Wiegand, I., Hilpert, K. y Hancock, R. E. W. (2008). Agar and Broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2): 163-175.
- Wu, Y.-Y., Zhang, T.-Y., Zhang, M.-Y., Cheng, J. y Zhang, Y.-X. (2018). An endophytic Fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 128, 265-271. doi:10.1016/j.fitote.2018.05.033

- Zhora, M. y Fawzia, A. (2014). Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. 5, 495-500.
- Zhou, K., Wang, W., Peng, Y., Yu, R., Yue, Y., Lai, D. y Zhou, L. (2015). Endophytic fungi from *Nicotiana tabacum* L. and their antibacterial activity. *Natural Product Research and Development*, 27(11), 1847-1852.
- Zuo, C., Zhang, W., Chen, Z., Chen, B. y Huang, Y. (2017). RNA Sequencing Reveals that Endoplasmic Reticulum Stress and Disruption of Membrane Integrity Underlie Dimethyl Trisulfide Toxicity against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical Race 4. *Frontiers in Microbiology*, 8(1365), 1-12. doi:10.3389/fmicb.2017.01365
- Zurita, J. (2012). Resistencia Bacteriana en el Ecuador. Centro de Publicaciones PUCE, Quito, Ecuador.

9. FIGURAS

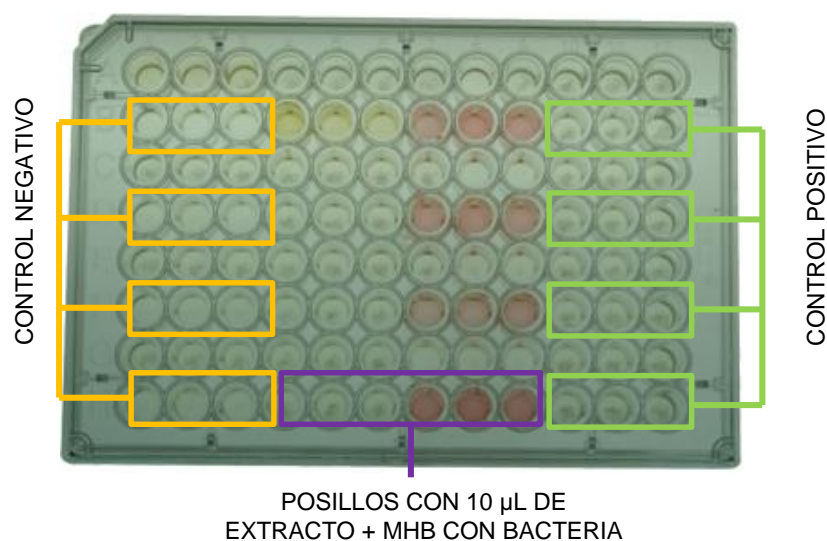


Figura 1. Disposición de los extractos en las placas de microtitulación de poliestireno (COSTAR 3590) de 96 pocillos. Los 10 μL de cada extracto en conjunto con 90 μL de la dilución se colocaron en triplicado. Como control positivo de crecimiento se colocó 90 μL de bacteria en conjunto con 10 μL de metanol, y como control negativo se colocó 90 μL de caldo Müller-Hinton Broth con 10 μL de metanol.

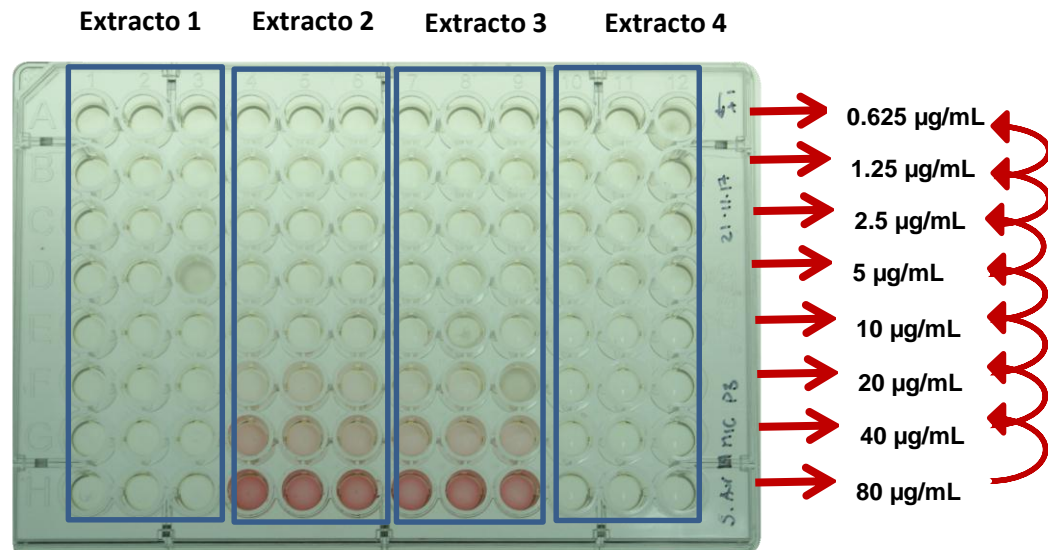


Figura 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución. Diluciones seriadas en metanol, diluyendo a la mitad cada extracto a partir de la solución madre de cada extracto, como se observa con claridad en el segundo y tercer extracto de la placa.

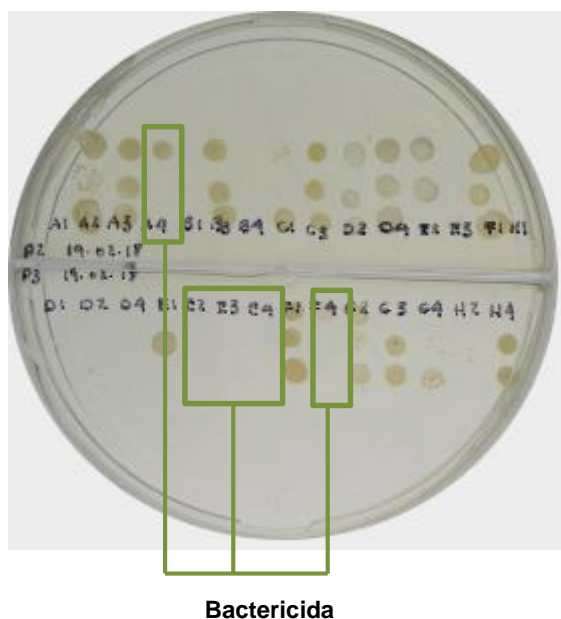


Figura 3. Actividad Bactericida o Bacteriostática de los extractos que mostraron inhibición, según las lecturas de absorbancias. Se colocó 10 μL del medio de cada pocillo en Placas Petri con agar Müller-Hinton y se incubaron por 24 horas a 35 °C, sólo se tomaron en cuenta los extractos que tuvieron una absorbancia similar a la del control negativo. Si ninguna o una de las tres repeticiones de cada extracto presentan crecimiento, este extracto tendrá un efecto bactericida, de lo contrario esta sólo presentará actividad bacteriostática.

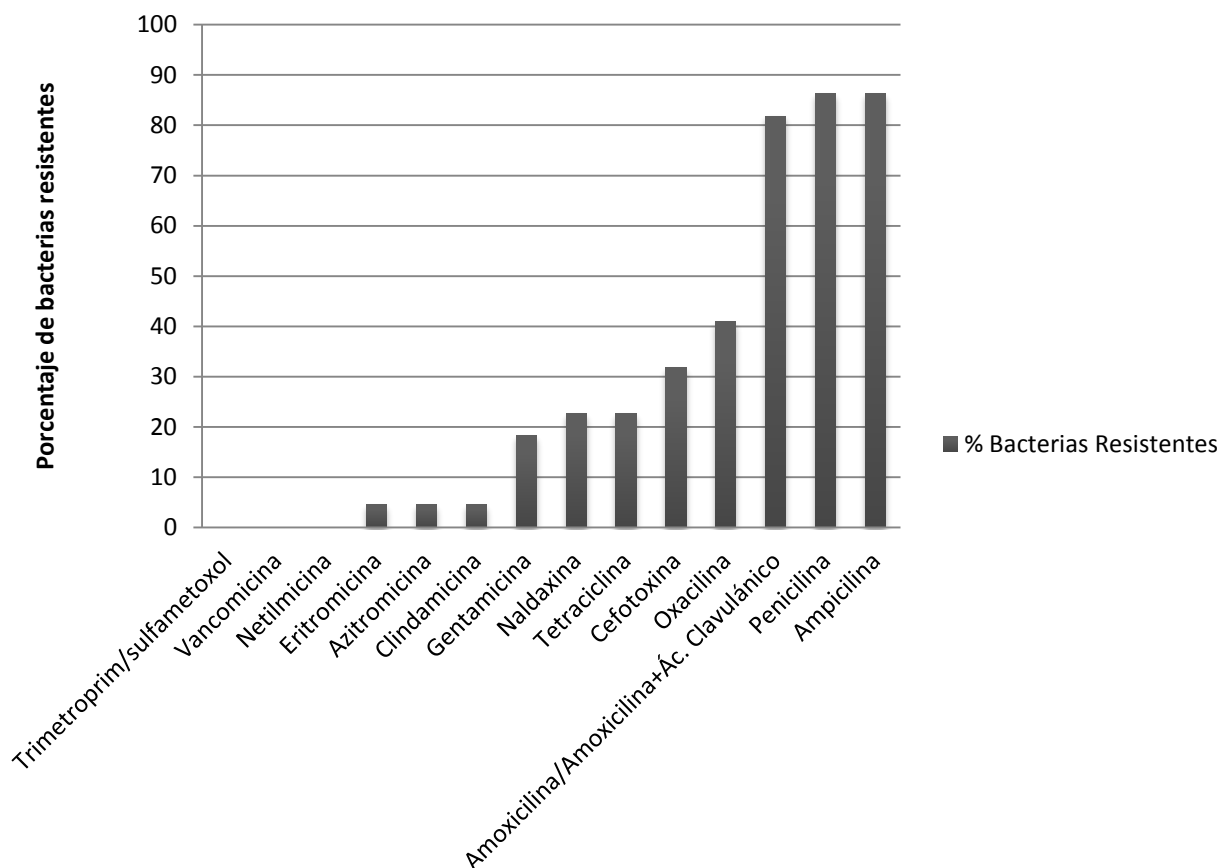


Figura 4. Porcentajes de resistencia antibiótica de bacterias *Staphylococcus aureus* multirresistentes a diversos antibióticos. Se realizó el perfil fenotípico, mediante difusión de disco, de veintidós cepas multiresistentes para confirmar la resistencia a 15 antibióticos, en el gráfico se muestra el porcentaje de bacterias que presentaron resistencia ante los antibióticos muestreados. Ninguna bacteria es resistente ante los antibióticos Trimetoprim/Sulfametoxol, Vancomicina y Netilmicina.

10.TABLAS

Tabla 1. Identificación taxonómica y solventes orgánicos de los 86 extractos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA

	CÓDIGO EXTRACTO	SOLVENTE	DIVISIÓN	ORDEN	ESPECIE
1	CEQCA -M0356 D1	DCM	-	-	-
2	CEQCA -M0369 D2	DCM	Ascomycota	<i>Botrytis</i>	<i>elliptica</i>
3	CEQCA -M0369 E1	EA	Ascomycota	<i>Botrytis</i>	<i>elliptica</i>
4	CEQCA -M0369 E2	EA	Ascomycota	<i>Botrytis</i>	<i>elliptica</i>
5	CEQCA -M0369 M2	MeOH	Ascomycota	<i>Botrytis</i>	<i>elliptica</i>
6	CEQCA -M1262 D1	DCM	Ascomycota	ND	ND
7	CEQCA -M1291 D2	DCM	Ascomycota	<i>Muscodor</i>	<i>vitignus</i>
8	CEQCA -M1320 E1	EA	-	-	-
9	CEQCA -O0185 D1	DCM	Ascomycota	<i>Penicillium</i>	<i>radicum</i>
10	CEQCA -O0522 E1	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
11	CEQCA -O0542 D1	DCM	-	-	-
12	CEQCA -O0557 D1	DCM	-	-	-
13	CEQCA -O0580 D1	DCM	-	-	-
14	CEQCA -O0628 D1	DCM	Ascomycota	ND	ND
15	CEQCA -O0628 E1	EA	Ascomycota	ND	ND
16	CEQCA -O0628 M1	MeOH	Ascomycota	ND	ND
17	CEQCA -O0666 D1	DCM	-	-	-
18	CEQCA -P0688 D3	DCM	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
19	CEQCA -P0688 E3	EA	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
20	CEQCA -O0751 M1	MeOH	-	-	-
21	CEQCA -O0964 D1	DCM	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	sp.

ND= No determinado
 EA= Etil acetato
 DCM= Diclorometano
 MeOH= Metanol

Tabla 1. Identificación taxonómica y solventes orgánicos de los 86 extractos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA (Continuación...)

	CÓDIGO EXTRACTO	SOLVENTE	DIVISIÓN	ORDEN	ESPECIE
22	CEQCA -O0964 D4	DCM	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
23	CEQCA -O0964 E2	EA	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
24	CEQCA -O0964 E3	EA	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
25	CEQCA -O0964 E4	EA	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
26	CEQCA -O0964 M2	MeOH	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
27	CEQCA -O0964 D2	DCM	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>sp.</i>
28	CEQCA -O1096 D1	DCM	-	-	-
29	CEQCA -O1111 D3	DCM	Ascomycota	ND	ND
30	CEQCA -O1111 E3	EA	Ascomycota	ND	ND
31	CEQCA -O1111 M3	MeOH	Ascomycota	ND	ND
32	CEQCA -O1111D2	DCM	Ascomycota	ND	ND
33	CEQCA -O1111 E2	EA	Ascomycota	ND	ND
34	CEQCA -O1113 E1	EA	ND	ND	ND
35	CEQCA -O1393 E2	EA	-	-	-
36	CEQCA -O1394 D9	DCM	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>helianthi</i>
37	CEQCA -O1394 E5	EA	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>helianthi</i>
38	CEQCA -O1394 E9	EA	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>helianthi</i>
39	CEQCA -O1394 M5	MeOH	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>helianthi</i>
40	CEQCA -O1399 D1	DCM	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>laevis</i>
41	CEQCA -O1399 E2	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>laevis</i>
42	CEQCA -O1399 E3	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>laevis</i>
43	CEQCA -O1399 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>laevis</i>
44	CEQCA -O3041 E1	EA	Ascomycota	<i>Umbelopsis</i>	<i>isabellina</i>
45	CEQCA -O3215 D4	DCM	Ascomycota	ND	ND
46	CEQCA -O3215 E1	EA	Ascomycota	ND	ND

ND= No determinado

EA= Etil acetato

DCM= Diclorometano

MeOH= Metanol

Tabla 1. Identificación taxonómica y solventes orgánicos de los 86 extractos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA (Continuación...)

	CÓDIGO EXTRACTO	SOLVENTE	DIVISIÓN	ORDEN	ESPECIE
47	CEQCA -O3215 E2	EA	Ascomycota	ND	ND
48	CEQCA -O3215 E3	EA	Ascomycota	ND	ND
49	CEQCA -O3215 M4	MeOH	Ascomycota	ND	ND
50	CEQCA -O3215 E4	EA	Ascomycota	ND	ND
51	CEQCA -P0212 D2	DCM	-	-	-
52	CEQCA -P0212 E1	EA	-	-	-
53	CEQCA -P0439 E4	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>acuta</i>
54	CEQCA -P0439 EA1/EA5	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	<i>acuta</i>
55	CEQCA -P0501 D1	DCM	Ascomycota	<i>Gliocladium</i>	sp.
56	CEQCA -P0501 D3	DCM	Ascomycota	<i>Gliocladium</i>	sp.
57	CEQCA -P0501 E3	EA	Ascomycota	<i>Gliocladium</i>	sp.
58	CEQCA -P0501 M3	MeOH	Ascomycota	<i>Gliocladium</i>	sp.
59	CEQCA -P0688 D1	DCM	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
60	CEQCA -P0688 E1	EA	Ascomycota	<i>Fusarium</i>	<i>oxysporum</i>
61	CEQCA -P5175 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
62	CEQCA -P5175D1	DCM	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
63	CEQCA -P5175E1	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
64	CEQCA -P5202 D1	DCM	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>brasiliensis</i>
65	CEQCA -P5202 E1	EA	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>brasiliensis</i>
66	CEQCA -P5202 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Diaporthe</i>	<i>brasiliensis</i>
67	CEQCA -P5227 D1	DCM	Ascomycota	<i>Elsinoe</i>	<i>eelemanii</i>
68	CEQCA -P5227 E1	EA	Ascomycota	<i>Elsinoe</i>	<i>eelemanii</i>
69	CEQCA -P5227 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Elsinoe</i>	<i>eelemanii</i>
70	CEQCA -P5309 D1	DCM	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.

ND= No determinado
EA= Etil acetato
DCM= Diclorometano
MeOH= Metanol

Tabla 1. Identificación taxonómica y solventes orgánicos de los 86 extractos obtenidos de hongos endófitos de la CEQCA (Continuación.)

	CÓDIGO EXTRACTO	SOLVENTE	DIVISIÓN	ORDEN	ESPECIE
71	CEQCA -P5309 E1	EA	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
72	CEQCA -P5309 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Xylaria</i>	sp.
73	CEQCA -P5342 D1	DCM	Ascomycota	<i>Hypoxylon</i>	<i>subrutiloides</i>
74	CEQCA -P5342 E1	EA	Ascomycota	<i>Hypoxylon</i>	<i>subrutiloides</i>
75	CEQCA -P5342 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Hypoxylon</i>	<i>subrutiloides</i>
76	CEQCA -P5343 D2	DCM	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
77	CEQCA -P5343 D3	DCM	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
78	CEQCA -P5343 E2	EA	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
79	CEQCA -P5343 E3	EA	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
80	CEQCA -P5343 M1	MeOH	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
81	CEQCA -P5343 M2	MeOH	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
82	CEQCA -P5343 M3	MeOH	Ascomycota	<i>Anthostomella</i>	sp.
83	CEQCA -P5363 D1	DCM	Ascomycota	ND	ND
84	CEQCA -P5363 D3	DCM	Ascomycota	ND	ND
85	CEQCA -P5363 E1	EA	Ascomycota	ND	ND
86	CEQCA -P5363 M1	MeOH	Ascomycota	ND	ND

ND= No determinado

EA= Etil acetato

DCM= Diclorometano

MeOH= Metanol

Tabla 2. Mecanismos de resistencia de las veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes del Laboratorio de Microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Código	Resistencia	Seis cepas representantes* del grupo
32C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , AMC ¹³ , CC ¹⁴ , FOX ⁴	
5 H ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , GM ¹² , AMC ¹³ , CC ¹⁴	
54C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , AMC ¹³	
12 SAUR	AM ² , P ³	
4 SAUR	AM ² , P ³ , GM ¹² , AMC ¹³ , CC ¹⁴	37C-ORSA (Resistencia a betalactámicos)
15 SAUR	AMC ¹³	
26 SAUR	AM ² , CC ¹⁴	
84 SAUR	AM ² , P ³ , AMC ¹³	
37C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , GM ¹² , TE ¹⁰	
20C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , TE ¹⁰ , AMC ¹³	8C-ORSA (Resistencia a cefalosporinas)
8C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , TE ¹⁰ , AMC ¹³	
28C-ORSA	AM ² , P ³ , TE ¹⁰	
30C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , TE ¹⁰ , AMC ¹³	
58 SAUR	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , TE ¹⁰ , GM ¹² , AMC ¹³ , CC ¹⁴	70 SAUR (Resistencia a tetraciclinas)
70 SAUR	AM ² , P ³ , TE ¹⁰ , GM ¹²	
19 SAUR	AM ² , P ³ , NA ⁵ , AMC ¹³	
23 SAUR	NA ⁵ , AMC ¹³	
50 SAUR	AM ² , P ³ , NA ⁵ , AMC ¹³ , CC ¹⁴	102C- ORSA (Resistencia a las quinolonas,)
17C-ORSA	AM ² , P ³ , NA ⁵ , AMC ¹³	
102C- ORSA	OX ¹ , P ³ , FOX ⁴ , NA ⁵ , AMC ¹³	
104 C-ORSA	OX ¹ , AM ² , P ³ , FOX ⁴ , SXT ⁹ , AMC ¹³	104 C-ORSA (Resistencia a sulfonamidas)
14 SAUR	AM ² , P ³ , AZM ⁷ , E ⁸ , AMC ¹³	14 SAUR (Resistencia a macrólidos)

* Cepas utilizadas en los bioensayos como representantes de los seis mecanismos de resistencia, en donde:

- La cepa 37C-ORSA representa a 8 cepas con las que comparte la resistencia a betalactámicos
- La cepa 8C-ORSA representa a la cepa 20C-ORSA con la que comparte la resistencia a cefalosporinas
- La cepa 70 SAUR representa a 3 cepas con las que comparte la resistencia a tetraciclinas
- La cepa 102C-ORSA representa 4 cepas con las que comparte la resistencia a quinolonas
- La cepa 104C-ORSA posee el mecanismo de resistencia a las sulfonamidas
- La cepa 14 SAUR posee el mecanismo de resistencia a los macrólidos

1. OX Oxacilina 2. AM Ampicilina 3. P Penicilina 4. FOX Cefoxitina 5. NA Ácido nalidíxico 6. NET Netilmicina
7. AZM Azitromicina 8. E Eritromicina 9. SXT Trimethoprim/sulfamethoxazole 10. TE Tetraciclina
11. VA Vancomicina 12. GM Gentamicina 13. AMC Amoxicilina con ácido clavulánico 14. CC Clindamicina

Tabla 3. Pruebas de sensibilidad fenotípica de veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes

Código Bacteria			OX (1µg)	AM (10 µg)	P (10 µg)	FOX (30 µg)	NA (30 µg)	NET (30 µg)	AZM (15 µg)	E (15 µg)	SXT (23,75 µg /1,25 µg)		TE (30 µg)	VA (30 µg)	GM (10 µg)	AMC (30 µg)	CC (2 µg)					
	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ	Actividad (CB-QCA)	Actividad Registrada ⁱ				
32C-ORSA*	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	I	SD		
5 H ORSA	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	SD	R	SD	I	SD	
54C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD		
12 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	S	SD	S	SD		
4 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	SD	R	SD	I	SD	
15 SAUR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD		
26 SAUR	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	S	SD	I	SD		
84 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD		
8C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	SD	R	SD	S	SD
17C-ORSA	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD		
20C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	SD	R	SD	S	SD
28C-ORSA	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	SD	S	SD	S	SD
30C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	SD	R	SD	S	SD
37C-ORSA*	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	SD	R	SD	S	SD
19 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD	
14 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	SD	R	SD	S	SD
23 SAUR	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD	
50 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	I	SD	
58 SAUR*	I	S	R	R	R	R	I	I	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SD	R	SD	R	SD
70 SAUR	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	SD	S	SD	S	SD
102C- ORSA	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD	
104 C-ORSA	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	SD	R	SD	S	SD		

* Bacterias que mostraron una reducción en su resistencia ante los antibióticos

SD= Sin datos (Antibióticos extra), S=Susceptible/ R=Resistencia/ I=Intermedio

ⁱ Actividad Registrada= Perfiles fenotípicos de sensibilidad antibiótica proveídos por el Laboratorio de Microbiología de la PUCE

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de los 41 extractos con bioactividad sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™

	Extracto	% de Inhibición (p=0,131)	Bioactividad *
1	O3215 E3	100	Bactericida
2	P0688 E1	100	Bactericida
3	O0964 D1	99,7	Bactericida
4	P5343 M3	99,4	Bactericida
5	P5343 D3	99,3	Bactericida
6	O3215 E1	98,9	Bactericida
7	M1320 E1	96,7	Bactericida
8	O1393 E2	95,5	Bactericida
9	P5175 M1	95,2	Bactericida
10	P5175 E1	93,5	Bactericida
11	P0688 D3	93,1	Bactericida
12	P0688 E3	93,1	Bactericida
13	O1111 E2	92,6	Bactericida
14	P0212 D2	91,5	Bactericida
15	O0964 E2	90,7	Bactericida
16	P5175 D1	89,6	Bactericida
17	P5342 M1	84,8	Bactericida
18	P0439 EA1/EA5	77,1	Bactericida
19	P0688 D1	74,1	Bactericida
20	P5227 M1	98	Bacteriostática
21	P5309 D1	97	Bacteriostática
22	O3215 M4	97	Bacteriostática
23	P5227 D1	95	Bacteriostática
24	P5363 M1	95	Bacteriostática
25	P5309 E1	94	Bacteriostática
26	O0964 D2	93,2	Bacteriostática
27	P5343 D2	89,9	Bacteriostática
28	O1111 D2	89,6	Bacteriostática
29	P5309 M1	87,4	Bacteriostática
30	M0369 E1	85,8	Bacteriostática
31	P5363 D3	85,6	Bacteriostática
32	O0964 E4	84,8	Bacteriostática
33	O3215 E4	84,5	Bacteriostática
34	P5342 D1	84,3	Bacteriostática
35	P5342 E1	83,8	Bacteriostática

* Bactericida: provoca la muerte bacteriana

Bacteriostática: inhibición del crecimiento bacteriano sólo si el agente bacteriostático se encuentra en el medio.

Tabla 4. Porcentajes de inhibición de los 41 extractos con bioactividad sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Continuación)

	Extracto	% de Inhibición	Bioactividad *
36	O0964 E3	81,5	Bacteriostática
37	P5343 E2	80,7	Bacteriostática
38	O3215 D4	74,2	Bacteriostática
39	P0501 D3	73,7	Bacteriostática
40	O1399 D1	73,3	Bacteriostática
41	O0628 E1	62,3	Bacteriostática

* Bactericida: provoca la muerte bacteriana

Bacteriostática: inhibición del crecimiento bacteriano sólo si el agente bacteriostático se encuentra en el medio.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición y actividad bactericida/ bacterioestática de 38 extractos de hongos endófitos sobre representantes de los seis mecanismos de resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes

Extracto	102C-ORSA ¹ (p=0,101)		104C-ORSA ² (p=0,133)		37C-ORSA ³ (p=0,067)		70-SAUR ⁴ (p=0,076)		14-SAUR ⁵ (p=0,182)		8C-ORSA ⁶ (p=0,055)	
	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad
1 M0369 E1	97,8	BC	98,9	BC	87,8	BC	87,2	BC	92,6	BC	91,4	BC
2 O0964 E2	93,9	BE	96,6	BC	77,7	BC	98,9	BC	90,9	BC	15,8	-
3 O3215 E1	100	BE	100	BE	71,2	-	94,2	BE	93,0	BE	53,4	-
4 P5342 D1	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
5 O1111 E2	99,3	BC	100	BC	65,9	BC	89,2	BC	96,3	BC	98,0	BC
6 M1320 E1	99,1	BE	100	BE	100	BC	0	BE	99,9	BE	97,9	BE
7 P0688 D1	98,2	BE	100	BC	75,9	BC	4,5	BC	81,6	BC	100	BC
8 P0212 D2	97,1	BE	89,3	BE	60,9	-	0	-	75,2	-	59,8	-
9 P5342 E1	0	-	0	-	0	-	100	BE	0	-	0	-
10 P0688 E1	98,2	BE	100	BE	99,7	BE	94,4	BE	100	BC	38,9	-
11 P5342 M1	79,2	-	46,2	-	45,8	-	99,8	-	74,5	-	81,2	BE
12 P5175 D1	17,1	BC	50,8	BC	22,7	BC	99,9	BE	24,9	BC	81,5	BC
13 O1393 E2	75,4	BC	94,2	BE	84,5	BE	100	BE	94,2	BE	46,8	-
14 O3215 E4	97,6	BE	100	BE	80,6	BE	100	BE	98,8	BE	99,1	BE
15 O1111 D2	100	BC	99,5	BC	61,9	BC	99,3	BC	96,6	BC	87,6	BE
16 P5175 E1	81,9	BE	92,4	BE	77,5	-	89,1	BC	92,3	BE	74,5	BC
17 P5343 M3	92,4	BE	81,9	BE	92,3	BE	77,5	BE	85,9	BE	95,1	BC
18 P5175 M1	75,5	BE	39,1	BE	71,3	BE	0	-	78,8	BE	36,1	-
19 P5227 D1	96,3	BE	34,4	BE	100	BC	82,4	BE	100	BC	71,1	BE
20 O3215 D4	92,9	BE	34,4	BE	97,3	BE	100	BE	95,6	BE	100	BC
21 P5309 D1	99,5	BC	61,8	BC	100	BC	97,1	BE	100	BC	85,2	BE
22 O0964 E4	81,9	BE	84,8	BE	88,3	BE	100	BC	69,0	BE	100	BC
23 P5343 D3	69,7	BC	80,5	BC	77,6	BC	92,0	BE	84,8	BC	55,9	-
24 P0501 D3	30,5	-	11,1	-	71,6	BE	52,3	-	72,2	BE	36,1	-
25 O3215 M4	60,8	BE	74,6	BE	79,1	BE	86,9	BE	75,8	BE	90,0	BE
26 O0964 E3	39,9	-	32,8	-	9,6	-	47,6	-	77,7	BE	75,7	BE
27 P0688 D3	98,0	BC	95,1	BC	98,6	BC	97,8	BC	99,3	BC	95,2	BC
28 P5343 D2	23,2	-	90,0	BE	42,5	-	66,2	-	47,4	-	45,1	-
29 P5363 M1	92,8	BC	84,8	BC	37,5	-	83,4	BC	98,4	BE	96,7	BC
30 P5309 M1	79,4	BE	62,5	BE	41,9	-	86,1	BE	55,1	-	95,2	BE

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacterioestática; (-) No hubo inhibición alguna

¹ Representante del mecanismo de resistencia a sulfonamidas (Tabla 2).

² Representante del mecanismo de resistencia a quinolonas (Tabla 2).

³ Representante del mecanismo de resistencia a macrólidos (Tabla 2).

⁴ Representante del mecanismo de resistencia a betalactámicos (Tabla 2).

⁵ Representante del mecanismo de resistencia a tetraciclinas (Tabla 2).

⁶ Representante del mecanismo de resistencia a cefalosporinas (Tabla 2).

Tabla 5. Porcentajes de inhibición y actividad bactericida/ bacterioestática de 38 extractos de hongos endófitos sobre representantes de los seis mecanismos de resistencia en cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes (Continuación)

Extracto	102C-ORSA ¹ (p=0,101)		104C-ORSA ² (p=0,133)		37C-ORSA ³ (p=0,067)		70-SAUR ⁴ (p=0,076)		14-SAUR ⁵ (p=0,182)		8C-ORSA ⁶ (p=0,055)	
	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad	% de Inhibición	Bioactividad
31 O1399 D1	40,2	-	26,9	-	44,8	-	67,5	-	53,9	-	47,9	-
32 P5227 M1 P0434	96,0	BE	100,	BE	100	BC	100	BE	100	BC	99,0	BC
33 EA1/EA5	96,5	BC	99,4	BC	96,0	BC	96,4	BC	96,7	BE	95,9	BC
34 O0628 E1	99,4	BC	100	BC	95,6	BC	96,2	BC	100	BC	96,2	BC
35 P5343 E2	0	-	0	-	0	-	0	-	2,2	-	10,6	-
36 P5309 E1	96,6	BE	99,4	BE	98,5	BE	97,8	BE	96,3	BE	98,6	BE
37 O0964 D2	78,5	BE	34,6	BE	60,3	-	70,2	-	75,9	-	59,8	-
38 P0688 E3	99,4	BC	100	BC	95,6	BC	96,2	BC	100	BC	96,2	BC

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacterioestática; (-) No hubo inhibición alguna

¹ Representante del mecanismo de resistencia a sulfonamidas (Tabla 2).

² Representante del mecanismo de resistencia a quinolonas (Tabla 2).

³ Representante del mecanismo de resistencia a macrólidos (Tabla 2).

⁴ Representante del mecanismo de resistencia a betalactámicos (Tabla 2).

⁵ Representante del mecanismo de resistencia a tetraciclinas (Tabla 2).

⁶ Representante del mecanismo de resistencia a cefalosporinas (Tabla 2).

Tabla 6. CMI y CMB de diecinueve extractos de hongos endófitos contra cepas representantes de los seis mecanismos de resistencia en *S. aureus* multirresistente

Extracto	Bacterias <i>S.aureus</i> Multiresistentes											
	104C-ORSA ¹ (p=0,057)		102-ORSA ² (p=0,221)		14-SAUR ³ (p=0,086)		37C-ORSA ⁴ (p=0,086)		70-SAUR ⁵ (p=0,084)		8C-ORSA ⁶ (p=0,598)	
	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
O0964 E2	13,6	>54,6	13,6	>54,6	13,6	>54,6	13,6	>54,6	54,6	>54,6	27,3	27,3
P0688 D1	14,5	14,5	14,5	14,5	7,2	29,07	14,5	14,5	-	-	29,07	> 58,1
M1320 E1	10	20	20	20	10	> 20	20	> 20	20	> 20	-	-
M0369 E1	156,6	> 313,2	313,2	> 313,2	78,3	> 313,2	78,3	> 313,2	313,2	> 313,2	78,3	156,6
O3215 E4	-	-	-	-	-	-	-	-	3,8	15,3	-	-
O1111 E2	4	8,1	4	>16,3	4	4	4	8,1	4	4	-	-
O1111 D2	0,8	1,6	1,6	1,6	1,6	3,3	1,6	1,6	1,6	>3,3	-	-
P5175 D1	15,05	> 15,05	15,05	> 15,05	15,05	> 15,05	-	-	15,05	> 15,05	-	-
P5175 E1	-	-	-	-	22	> 22	-	-	22	> 22	11	> 22
P5227 M1	41	>328	328	> 328	328	> 328	328	> 328	164	> 328	328	> 328
P5309 D1	13,8	> 13,8	13,8	> 13,8	13,8	> 13,8	13,8	> 13,8	13,8	> 13,8	13,8	> 13,8
P5363 M1	5,5	88,05	11	176,1	5,5	> 176,1	11	44,02	11	44,02	11	22,01
O0628 E1	8,3	> 8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P5309 E1	10,5	> 21,1	10,5	> 21,1	10,5	21,1	5,2	> 21,1	0,6	> 21,1	10,5	> 21,1
O3215 D4	10,6	> 10,6	10,6	> 10,6	10,6	> 10,6	10,6	> 10,6	5,3	> 10,6	10,6	> 10,6
O0964 E4	52,2	52,2	52,2	> 52,2	52,2	52,2	-	-	52,2	> 52,2	52,2	> 52,2
P5343 M3	32,06	> 128,2	32,06	> 128,2	32,06	> 128,2	32,06	> 128,2	32,06	> 128,2	32,06	> 128,2
P0688 D3	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	1,03	2,07	2,07	1,03	1,03	1,03	1,03
P0688 E3	4,3	> 17,2	2,1	8,6	4,3	4,3	4,3	8,6	4,3	4,3	4,3	4,3

(-) No hubo inhibición en ninguna de las concentraciones ensayadas

¹ Cepa representante del mecanismo de resistencia a sulfonamidas (Tabla 2).

² Cepa representante del mecanismo de resistencia a quinolonas (Tabla 2).

³ Cepa representante del mecanismo de resistencia a macrólidos (Tabla 2).

⁴ Cepa representante del mecanismo de resistencia a betalactámicos (Tabla 2).

⁵ Cepa representante del mecanismo de resistencia a tetraciclinas (Tabla 2).

⁶ Cepa representante del mecanismo de resistencia a cefalosporinas (Tabla 2).

Tabla 7. Porcentajes de inhibición y actividad bactericida/ bacterioestática de quince extractos orgánicos sobre dieciséis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes según su mecanismo de resistencia

			Bacterias <i>S.aureus</i> Multiresistentes															
			Bacterias resistentes a betalactámicos ¹															
			32C-ORSA (p=0,147)		5H-ORSA (p=0,083)		54C-ORSA (p=0,868)		12-SAUR (p=0,105)		4-SAUR (p=0,990)		15-SAUR (p=0,529)		26-SAUR (p=0,374)		84-SAUR (p=0,152)	
Extracto	Concentración (mg/L)		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
1	O1111 E2 (4)		96,5	BC	97,2	BC	75,1	BC	100	BC	85,1	BC	72,9	BC	92,1	BC	80,3	BC
	O1111 E2 (8,1)						95,7	BC			94,5	BC	0	-	90,9	BC		
2	M0369 E1 (156,6)		89,7	BE					94,8	BE								
	M0369 E1 (78,3)																	
3	O1111 D2 (1,6)		77,1	BE	78,6	BE	94,5	BE	97,6	BE	70,3	BE	88,6	BE	83,2	BE	77,5	BE
4	P5175 E1 (22)																	
5	P0688 D1 (14,5)		90,9	BE					80,1	BE								
	P0688 D1 (29,07)																	
6	P5175 D1 (15,05)																	
7	M1320 E1 (20)						94,6	BE	94,5	BC	87,7	BE	88,2	BE	0	BE		
8	O3215 E4 (15,3)																	
	P5363 M1 (22,01)																	
9	P5363 M1 (44,02)		70,9	BE	58,4	-	0	-	100	BC	97,6	BE	99,5	BE	88,0	BE	97,9	BE
	P5363 M1 (176,1)																	
10	P0688 D3 (1,03)																	
	P0688 D3 (2,07)		97,2	BC	81,6	BE	0	-	94,6	BC	41,3	-	0	-	0	-	0,1	-
	P0688 E3 (4,3)																	
11	P0688 E3 (8,6)		54,4	-	85,9	BE	93,2	BE	100	BC	80,0	BE	83,3	BE	96,1	BC	100	BC
12	O3215 D4 (21,2)		88,1	BE	95,6	BE	73,5	BC	90,5	BC	89,7	BC	72,4	BE	82,5	BC	100	
13	O0964 E4 (52,2)		0,9	-	62,6	-	0	-	30,7	-	19,9	-	0	-	0	-	20,4	-
	O0964 E4 (104,5)																	
14	P5227 M1 (328)														97,2	BC		
	P5227 M1 (656)		80,6	BE	34,5	-	86,3	BC	78,8	BC	96,9	BC	92,0	BC			88,6	BE
15	O0628 E1 (16,7)		100	BE	94,9	BC	98,5	BC	100	BC	92,3	BC	98,8	BC	99,6	BC	100	BC
16	P5309 E1 (21,1)		0	-	99,1	BC	29,4	-	92,8	BC	96,2	BE	37,7	-	70,9	BE	85,6	BE

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacterioestática; (-) No hubo inhibición alguna

Casillas vacías= no se probó extracto en esa bacteria, ya que no tuvieron actividad contra la bacteria representante (Tabla 2).

¹ Cepas dentro del mecanismo de resistencia de la cepa 37C-ORSA con resistente a betalactámicos (Tabla 2).

² Cepas dentro del mecanismo de resistencia de la cepa 70-SAUR con resistente a tetraciclinas (Tabla 2).

³ Cepas dentro del mecanismo de resistencia de la cepa 102C-ORSA con resistente a quinolonas (Tabla 2).

⁴ Cepas dentro del mecanismo de resistencia de la cepa 8C-ORSA con resistente a cefalosporinas (Tabla 2).

Tabla 8. Porcentajes de hemólisis de dieciséis extractos de hongos endófitos en las concentraciones ensayadas contra las veintidós cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes

	EXTRACTO	CONCENTRACIÓN EXTRACTO (mg/ μ L)	% HEMÓLISIS (p=0,468)
1	O3215 E4	15,3	4,4
	P0688 D3	2,07	4,8
2	P0688 D3	1,03	2,4
	P0688 E3	8,6	3,1
3	P0688 E3	4,3	1,9
	P0688 D1	29,07	1,3
4	P0688 D1	14,5	0,3
	O1111 E2	8,1	29,1
5	O1111 E2	4,07	13,7
	O1111 D2	3,3	1,5
6	O1111 D2	1,6	2,7
	O0964 E4	104,5	30,5
7	O0964 E4	52,2	0,9
	O0628 E1	16,7	5,2
8	O3215 D4	21,2	0,6
	P5227 M1	656	0,3
10	P5227 M1	328	3,3
	P5363 M1	176,1	16,5
11	P5363 M1	44,02	45,8
	P5363 M1	22,01	58,1
12	P5309 E1	21,1	10,5
13	P5175 D1	15,05	73,7
14	P5175 E1	22	100
15	M1320 E1	20	3,2
	M0369 E1	313,2	0,6
16	M0369 E1	156,6	0,4
	M0369 E1	78,3	0,3

Tabla 9. Información taxonómica molecular de seis hongos endófitos identificados en este estudio

Código CEQCA	PRIMER F	PRIMER R	Porcentaje de cobertura	MAX ID	Filum	Clase	Orden	Familia	Genero	Especie
O0666	ITS1	ITS4	100%	100%	Ascomycota	Sordariomycetes	Sordariales	Sordariaceae	<i>Neurospora</i>	<i>crassa</i>
O0557	ITS1	ITS4	83%	96%	Ascomycota	Sordariomycetes				
O0580	ITS1	ITS4	72%	99%	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i>	<i>sp</i>
P0212	ITS1	ITS4	100%	100%	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Ilyonectria</i>	<i>sp</i>
O0751	ITS1	ITS4	100%	100%	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	<i>sp</i>
O1096	ITS1	ITS4	100%	99%	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	<i>sp</i>

11. ANEXOS

Anexo 1. Mecanismos de acción de los distintos agentes microbianos

Agentes antimicrobianos	Mecanismo de acción
Macrólidos Aminoglucósidos Tetraciclonas	Se unen a la subunidad 30S del ribosoma, inhibiendo la síntesis proteica.
Cloranfenicol Estreptograminas Oxazolidinonas	Se unen a la subunidad 50S del ribosoma, inhibiendo la síntesis proteica.
Fluoroquinolonas Trimetroprim Rifampicina	Interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos, mediante disrupción en la síntesis del ADN. Mediante el rompimiento de la doble hélice del ADN e inhibición de las topoisomerasas.
β -lactámicos	Inhiben la síntesis de la pared celular al interferir con las enzimas involucradas en la síntesis de la capa de peptidoglicano
Polimixina Daptomicina	Causan una disrupción de la membrana bacteriana, al aumentar la permeabilidad de la membrana o al insertar una cola lipídica en la membrana celular

Basado en: Hoerr et al., 2016; Tenover, 2006.

Anexo 2. Porcentaje de inhibición y actividad bactericida y bacteriostática de veintisiete extractos de hongos endófitos de la CEQCA sobre *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 según información de la base de datos de la CEQCA

Código del extracto	Código hongo endófito	Porcentaje de Inhibición	Bactericida/Bacteriostático
CEQCA-O1096 D1	CEQCA-O1096	100	Inhibición total
CEQCA-M1291 D2	CEQCA-M1291	100	Bactericida
CEQCA-M1262 D1	CEQCA-M1262	100	Inhibición total
CEQCA-O0542 D1	CEQCA-O0542	83,86	Bactericida
CEQCA-O0580 D1	CEQCA-O0580	72,88.	Bactericida
CEQCA-O0557 D1	CEQCA-O0557	100	Bactericida
CEQCA-O0666 D1	CEQCA-O0666	100	Bactericida
CEQCA-P0212 D2	CEQCA-P0212	93,26.	Bactericida
CEQCA-P0688 D1	CEQCA-P0688	83,2	Bactericida
CEQCA-O0185 D1	CEQCA-O0185	100	Bactericida
CEQCA-O0964 D1	CEQCA-O0964	100	Bacteriostático
CEQCA-P0439 E4	CEQCA-P0439	100	Inhibición total
CEQCA-M1320 E1	CEQCA-M1320	100	Inhibición total
CEQCA-M0369 E1	CEQCA-M0369	100	Inhibición total
CEQCA-M0356 E1	CEQCA-M0356	100	Inhibición total
CEQCA-O1113 E1	CEQCA-O1113	85,96	Bacteriostático
CEQCA-O0522 E1	CEQCA-O0522	76,44	Bactericida
CEQCA-O3041 E1	CEQCA-O3041	92,43	Bactericida
CEQCA-O3215 E1	CEQCA-O3215	71,64	Bacteriostático
CEQCA-P0688 E1	CEQCA-P0688	81,02	Bacteriostático
CEQCA-O1394 E5	CEQCA-O1394	100	Inhibición total
CEQCA-O1399 E2	CEQCA-O1399	100	Inhibición total
CEQCA-O1393 E2	CEQCA-O1393	100	Inhibición total
CEQCA-O3215 E3	CEQCA-O3215	77,09	Bacteriostático
CEQCA-P0212 E1	CEQCA-P0212	100	Bacteriostático
CEQCA-O0964 E2	CEQCA-P0964	129,26	Bacteriostático
CEQCA-O0751 M1	CEQCA-P0751	100	Bacteriostático

Anexo 3. Consentimiento del uso de sangre para los ensayos de citotoxicidad

HOJA DE INFORMACIÓN

Se solicita su participación para un proyecto que consiste en determinar el potencial citotóxico de extractos de hongos endófitos.

Este documento se le proporciona para darle la información suficiente para que usted pueda entender los posibles riesgos y beneficios derivados de su participación en este proyecto y decida si desea participar o no en el mismo, ya que la participación es absolutamente voluntaria.

La venopunción es la técnica por la cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis. Este procedimiento tiene como objetivo utilizar la muestra para el posterior análisis de citotoxicidad. El protocolo de recolección de muestra de sangre se lo realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia. En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son:

- Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese.
- Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días.
- Riesgo leve de infección.
- En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales..

Certificado de consentimiento

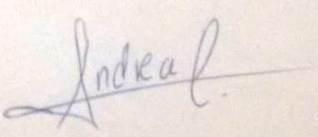
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

Fecha: 20 de enero 2018

Investigador responsable: Katherine Rosales

Nombre del donante: Carolina Castro

Se me ha solicitado dar mi consentimiento para que me realicen la extracción de sangre. Reconozco que me han INFORMADO de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. El Laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad Católica del Ecuador NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.


 Firma

Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes para determinar la CMI y CMB

Extracto	Dilución (mg/μL)	104C-ORSA (p=0,057)		102-ORSA (p=0,221)		14-SAUR (p=0,086)		37C-ORSA (p=0,0,086)		70-SAUR (p=0,084)		8C-ORSA (p=0,598)	
		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
O0964 E2	(54,6)	100	BE	100	BE	100	BE	100	BE	83,4	BE	98,8	BC
O0964 E2	(27,3)	97,2	BE	100	BE	99,9	BE	92,8	BE	74,5	-	96,7	BC
O0964 E2	(13,6)	90,3	BE	95,3	BE	98,1	BE	80,4	BE	35,6	-	78,2	-
O0964 E2	(6,8)	75,9	-	62,1	-	69,7	-	40,4	-	45,2	-	52,9	-
O0964 E2	(3,4)	59,9	-	33,7	-	63,1	-	30,5	-	19,0	-	32,7	-
O0964 E2	(1,7)	54,9	-	46,7	-	65,6	-	39,7	-	62,9	-	39,6	-
O0964 E2	(0,8)	0	-	37,3	-	64,1	-	37,8	-	26,9	-	30,7	-
O0964 E2	(0,4)	18,6	-	38,1	-	61,5	-	43,2	-	63,5	-	15,9	-
P0688 D1	(58,1)	94,9	BC	100	BC	100	BC	100	BC	64,3	-	99,4	BE
P0688 D1	(29,07)	94,2	BC	95,5	BC	100	BC	93,2	BC	0	-	91,9	BE
P0688 D1	(14,5)	95,4	BC	92,1	BC	100	BE	92,3	BC	60,9	-	49,0	-
P0688 D1	(7,2)	81,2	-	71,7	-	95,7	BE	21,5	-	54,8	-	37,9	-
P0688 D1	(3,6)	64,9	-	45,9	-	70,3	-	0	-	11,5	-	42,3	-
P0688 D1	(1,8)	43,1	-	62,4	-	64,4	-	20,4	-	69,8	-	36,4	-
P0688 D1	(0,9)	0	-	0	-	60,0	-	8,8	-	68,6	-	44,9	-
P0688 D1	(0,4)	72,3	-	0	-	53,9	-	60,3	-	6,1	-	10,5	-
M1320 E1	(20)	94,2	BC	98,3	BC	100	BE	98,7	BE	100	BE	57,1	-
M1320 E1	(10)	81,7	BE	79,3	-	91,7	BE	70,3	-	86,4	BE	41,1	-
M1320 E1	(5)	14,9	-	0	-	68,3	-	19,8	-	98,8	-	71,6	-
M1320 E1	(2,5)	55,7	-	0	-	55,1	-	16,1	-	36,7	-	43,1	-
M1320 E1	(1,2)	27,8	-	37,4	-	14,4	-	0	-	71,8	-	50,8	-
M1320 E1	(0,6)	29,1	-	40,4	-	56,7	-	0,8	-	71,2	-	32,8	-
M1320 E1	(0,3)	30,2	-	46,3	-	52,6	-	52,9	-	65,9	-	57,8	-
M1320 E1	(0,1)	21,4	-	51,4	-	56,3	-	38,9	-	68,3	-	32,9	-
M0369 E1	(313,2)	100	BE	100	BE	100	BE	109,9	BE	92,7	BE	100	BC
M0369 E1	(156,6)	88,6	BE	74,5	-	99,6	BE	98,9	BE	60,8	-	100	BC
M0369 E1	(78,3)	78,9	-	50,6	-	93,6	BE	82,8	BE	41,7	-	90,9	BE
M0369 E1	(39,1)	48,3	-	28,8	-	67,2	-	44,8	-	59,7	-	53,4	-
M0369 E1	(19,5)	59,9	-	22,9	-	61,7	-	0	-	30,7	-	29,2	-
M0369 E1	(9,7)	0	-	43,2	-	61,9	-	19,4	-	14,8	-	29,7	-
M0369 E1	(4,8)	33,4	-	0	-	42,3	-	0	-	0	-	5,8	-
M0369 E1	(2,4)	0	-	20,3	-	37,0	-	0	-	18,1	-	15,7	-

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacteriostática; (-) No hubo inhibición alguna

Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes para determinar la CMI y CMB (Continuación...)

Extracto	Dilución (mg/μL)	104C- ORSA (p=0,057)		102- ORSA (p=0,221)		14- SAUR (p=0,086)		37C- ORSA (p=0,0,086)		70- SAUR (p=0,084)		8C- ORSA (p=0,598)	
		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
O3215 E4	(15,3)	69,3	-	13,9	-	69,5	-	51,7	-	95,9	BC	48,9	-
O3215 E4	(7,6)	51,6	-	2,7	-	60,5	-	0	-	85,7	BE	67,7	-
O3215 E4	(3,8)	62,3	-	0	-	58,6	-	29,6	-	85,8	BE	42,9	-
O3215 E4	(1,9)	57,1	-	0	-	56,4	-	0	-	69,6	-	49,7	-
O3215 E4	(0,9)	0	-	0	-	46,8	-	10,6	-	63,7	-	40,8	-
O3215 E4	(0,4)	0	-	0	-	48,3	-	58,5	-	68,6	-	57,9	-
O3215 E4	(0,2)	0	-	0	-	40,9	-	20,9	-	53,5	-	36,2	-
O3215 E4	(0,1)	0	-	0	-	33,3	-	32,6	-	16,8	-	33,2	-
O1111 E2	(16,3)	100	BC	100	BE	100	BC	100	BC	100	BC	57,7	-
O1111 E2	(8,1)	92,1	BC	100	BE	100	BC	98,9	BC	100	BC	67,9	-
O1111 E2	(4)	89,3	BE	100	BE	99,3	BC	75,7	BE	90,0	BC	61,7	-
O1111 E2	(2)	71,7	-	38,2	-	72,1	-	1,7	-	65,4	-	49,4	-
O1111 E2	(1)	62,9	-	27,7	-	65,9	-	20,9	-	60,0	-	43,9	-
O1111 E2	(0,5)	27,6	-	35,2	-	59,7	-	2,2	-	0	-	44,8	-
O1111 E2	(0,2)	0	-	28,9	-	51,1	-	38,4	-	0	-	13,8	-
O1111 E2	(0,1)	0	-	0	-	50,8	-	12,9	-	0	-	19,9	-
O1111 D2	(3,3)	100	BC	100	BC	100	BC	100	BC	100	BE	63,2	-
O1111 D2	(1,6)	100	BC	99,8	BC	100	BE	100	BC	100	BE	6,5	-
O1111 D2	(0,8)	80,3	BE	64,2	-	74,4	-	0	-	61,4	-	10,2	-
O1111 D2	(0,4)	68,2	-	48,8	-	59,9	-	0	-	65,2	-	21,3	-
O1111 D2	(0,2)	0,6	-	50,4	-	8,6	-	43,4	-	0	-	18,1	-
O1111 D2	(0,1)	0	-	16,1	-	58,7	-	43,3	-	43,2	-	18,5	-
O1111 D2	(0,05)	71,8	-	46,8	-	51,8	-	40,3	-	38,6	-	27,1	-
O1111 D2	(0,02)	66,9	-	52,0	-	53,0	-	55,6	-	43,7	-	0	-
P5175 D1	(15,05)	96,3	BE	74,8	BE	94,4	BE	61,0	-	93,2	BE	24,6	-
P5175 D1	(7,5)	57,4	-	22,4	-	43,8	-	19,8	-	0	-	5,7	-
P5175 D1	(3,7)	29,7	-	34,2	-	49,6	-	19,4	-	57,2	-	37,9	-
P5175 D1	(1,8)	0	-	0	-	54,9	-	0	-	0	-	41,5	-
P5175 D1	(0,9)	1,8	-	47,8	-	53,9	-	0	-	55,7	-	30,6	-
P5175 D1	(0,4)	3,2	-	0	-	57,3	-	36,7	-	19,9	-	30,6	-
P5175 D1	(0,2)	65,1	-	14,6	-	63,5	-	16,1	-	55,1	-	56,6	-
P5175 D1	(0,1)	29,3	-	0	-	64,5	-	26,4	-	30,7	-	41,3	-

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacteriostática; (-) No hubo inhibición alguna

Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes para determinar la CMI y CMB (Continuación...)

Extracto	Dilución (mg/μL)	104C-ORSA (p=0,057)		102-ORSA (p=0,221)		14-SAUR (p=0,086)		37C-ORSA (p=0,0,086)		70-SAUR (p=0,084)		8C-ORSA (p=0,598)	
		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
P5175 E1	(22)	61,6	-	36,8	-	89,3	BE	38,7	-	85,8	BE	70,5	BE
P5175 E1	(11)	0	-	41,1	-	45,2	-	0	-	35,3	-	87,1	BE
P5175 E1	(5,5)	2,9	-	0	-	21,4	-	24,9	-	31,4	-	37,6	-
P5175 E1	2,7)	14,2	-	42,2	-	49,6	-	3,3	-	0	-	42,4	-
P5175 E1	(1,3)	26,5	-	43,6	-	58,2	-	11,2	-	50,6	-	32,1	-
P5175 E1	(0,6)	73,9	-	0	-	64,8	-	22,5	-	6,6	-	41,8	-
P5175 E1	(0,3)	31,8	-	35,7	-	62,2	-	18,7	-	54,3	-	53,9	-
P5175 E1	(0,1)	19,5	-	42,4	-	61,9	-	57,9	-	34,3	-	30,6	-
P5227 M1	(328)	95,6	BE	82,0	BE	80,9	BE	89,8	BE	94,1	BE	89,0	BE
P5227 M1	(164)	93,9	BE	66,5	-	26,4	-	42,4	-	92,5	BE	62,9	-
P5227 M1	(82)	96,3	BE	54,2	-	26,9	-	30,6	-	36,5	-	59,4	-
P5227 M1	(41)	91,7	BE	32,8	-	26,0	-	27,0	-	17,8	-	49,9	-
P5227 M1	(20,5)	24,9	-	0	-	0	-	25,5	-	14,8	-	34,3	-
P5227 M1	(10,2)	9,1	-	0	-	0	-	24,6	-	2,9	-	19,4	-
P5227 M1	(5,1)	18,1	-	22,2	-	0	-	36,5	-	32,4	-	27,6	-
P5227 M1	(2,5)	35,4	-	11,4	-	0	-	27,3	-	39,9	-	45,5	-
P5309 D1	(13,8)	81,7	BE	81,1	BE	78,9	BE	81,6	BE	77,9	BE	75,2	BE
P5309 D1	(6,9)	58,4	-	52,1	-	59,9	-	66,9	-	50,9	-	67,3	-
P5309 D1	(3,4)	55,3	-	37,8	-	37,6	-	57,4	-	48,3	-	71,6	-
P5309 D1	(1,7)	49,3	-	16,1	-	12,3	-	42,2	-	41,9	-	54,4	-
P5309 D1	(0,8)	41,0	-	41,0	-	23,0	-	52,2	-	35,7	-	52,0	-
P5309 D1	(0,4)	42,3	-	36,9	-	24,9	-	43,9	-	41,1	-	53,5	-
P5309 D1	(0,2)	40,6	-	34,5	-	10,2	-	39,4	-	46,5	-	45,9	-
P5309 D1	(0,1)	37,5	-	14,3	-	0	-	31,2	-	44,8	-	35,5	-
P5363 M1	(176,1)	94,6	BC	95,4	BC	94,8	BE	97,4	BC	80,7	BC	94,6	BC
P5363 M1	(88,05)	92,2	BC	94,3	BE	96,3	BE	97,5	BC	80,2	BC	92,5	BC
P5363 M1	(44,02)	93,4	BE	95,9	BE	98,5	BE	96,2	BC	80,2	BC	97,5	BC
P5363 M1	(22,01)	97,1	BE	98,0	BE	98,3	BE	97,4	BE	73,9	BE	97,7	BC
P5363 M1	(11)	81,2	BE	81,4	BE	87,4	BE	93,6	BE	74,3	BE	94,8	BE
P5363 M1	(5,5)	76,1	BE	59,9	-	80,7	BE	76,7	-	57,8	-	86,5	-
P5363 M1	(2,7)	42,8	-	23,0	-	7,7	-	38,1	-	38,3	-	36,1	-
P5363 M1	(1,3)	43,7	-	28,5	-	0	-	23,2	-	36,6	-	29,3	-

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacteriostática; (-) No hubo inhibición alguna

Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes para determinar la CMI y CMB (Continuación...)

Extracto	Dilución (mg/μL)	104C-ORSA (p=0,057)		102-ORSA (p=0,221)		14-SAUR (p=0,086)		37C-ORSA (p=0,0,086)		70-SAUR (p=0,084)		8C-ORSA (p=0,598)	
		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
P5309 E1	(21,1)	95,1	BE	96,5	BE	97,1	BC	96,2	BE	99,8	BE	95,9	BE
P5309 E1	(10,5)	90,7	BE	91,4	BE	96,5	BE	91,1	BE	98,9	BE	95,8	BE
P5309 E1	(5,2)	60,9	-	57,0	-	75,8	-	78,0	BE	80,6	BE	67,9	-
P5309 E1	(2,6)	53,9	-	16,4	-	54,4	-	30,6	-	80,2	BE	47,0	-
P5309 E1	(1,3)	43,0	-	34,6	-	62,4	-	45,9	-	79,3	BE	46,9	-
P5309 E1	(0,6)	43,4	-	33,3	-	55,4	-	43,5	-	74,5	BE	51,6	-
P5309 E1	(0,3)	42,6	-	19,1	-	48,8	-	22,2	-	48,3	-	49,2	-
P5309 E1	(0,1)	41,9	-	7,3	-	22,6	-	1,4	-	50,5	-	29,2	-
O3215 D4	(10,6)	82,2	BE	83,6	BE	93,6	BE	83,8	BE	99,3	BE	80,5	BE
O3215 D4	(5,3)	73,4	-	56,2	-	71,9	-	59,6	-	84,7	BE	73,2	-
O3215 D4	(2,6)	58,3	-	31,1	-	51,7	-	35,1	-	60,2	-	54,7	-
O3215 D4	(1,3)	52,9	-	7,9	-	16,9	-	21,4	-	51,5	-	55,1	-
O3215 D4	(0,6)	59,4	-	53,3	-	47,6	-	44,1	-	57,9	-	44,7	-
O3215 D4	(0,3)	53,3	-	31,7	-	58,8	-	54,3	-	61,8	-	56,8	-
O3215 D4	(0,1)	53,1	-	38,4	-	41,8	-	22,9	-	51,2	-	53,2	-
O3215 D4	(0,08)	51,3	-	0	-	16,6	-	5,5	-	53,3	-	39,1	-
O0964 E4	(52,2)	99,8	BC	95,2	BE	99,5	BC	99,5	-	60,7	BE	96,9	BE
O0964 E4	(26,1)	63,3	-	46,7	-	59,2	-	37,6	-	60,7	-	64,7	-
O0964 E4	(13,06)	53,6	-	38,6	-	60,2	-	34,6	-	76,1	-	63,2	-
O0964 E4	(6,5)	55,7	-	3,9	-	11,9	-	7,2	-	57,6	-	39,4	-
O0964 E4	(3,2)	53,4	-	29,4	-	42,8	-	24,3	-	50,1	-	47,6	-
O0964 E4	(1,6)	57,2	-	39,6	-	29,2	-	30,3	-	54,9	-	54,9	-
O0964 E4	(0,8)	55,7	-	32,9	-	28,9	-	23,1	-	50,5	-	44,9	-
O0964 E4	(0,4)	52,3	-	10,8	-	16,3	-	0	-	44,1	-	29,8	-
O0628 E1	(8,3)	87,5	BE	25,8	-	43,1	-	17,3	-	11,8	-	33,8	-
O0628 E1	(4,1)	50,3	-	25,6	-	52,3	-	38,7	-	33,7	-	40,6	-
O0628 E1	(2,08)	48,2	-	48,9	-	59,7	-	43,6	-	38,9	-	43,9	-
O0628 E1	(1,04)	47,3	-	37,6	-	52,9	-	30,1	-	31,4	-	14,1	-
O0628 E1	(0,5)	35,8	-	50,2	-	49,2	-	38,8	-	43,0	-	48,0	-
O0628 E1	(0,2)	41,9	-	46,0	-	53,3	-	22,4	-	71,2	-	40,2	-
O0628 E1	(0,1)	47,8	-	31,6	-	42,8	-	19,2	-	55,8	-	37,8	-
O0628 E1	(0,06)	46,5	-	22,1	-	35,2	-	7,3	-	17,6	-	16,4	-

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacteriostática; (-) No hubo inhibición alguna

Anexo 4. Porcentajes de inhibición y bioactividad de las diluciones de los extractos ensayados sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes para determinar la CMI y CMB (Continuación.)

Extracto	Dilución (mg/μL)	104C-ORSA (p=0,057)		102-ORSA (p=0,221)		14-SAUR (p=0,086)		37C-ORSA (p=0,0,086)		70-SAUR (p=0,084)		8C-ORSA (p=0,598)	
		% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad	% Inhibición	Bioactividad
P5343 M3	(128,2)	81,8	BE	88,3	BE	84,8	BE	98,7	BE	91,5	BE	85,3	BE
P5343 M3	(64,1)	94,8	BE	78,9	BE	77,1	BE	85,7	BE	84,9	BE	81,9	BE
P5343 M3	(32,06)	94,8	BE	78,9	BE	77,1	BE	85,7	BE	84,9	BE	81,9	BE
P5343 M3	(16,03)	39,4	-	0	-	0	-	31,4	-	22,3	-	31,0	-
P5343 M3	(8,0)	51,4	-	0	-	0	-	3,5	-	0	-	0	-
P5343 M3	(4,0)	45,3	-	11,1	-	0	-	8,7	-	12,3	-	8,6	-
P5343 M3	(2,0)	50,6	-	10,6	-	0	-	16,5	-	16,9	-	20,5	-
P5343 M3	(1,0)	43,3	-	13,4	-	0	-	11,7	-	0	-	0	-
P0688 D3	(33,1)	95,7	BC	99,7	BC	99,7	BC	98,9	BC	95,0	BC	99,8	BC
P0688 D3	(16,5)	84,4	BC	99,8	BC	99,8	BC	98,9	BC	79,1	BC	90,4	BC
P0688 D3	(8,2)	90,2	BC	100	BC	99,7	BC	98,4	BC	79,3	BC	88,6	BC
P0688 D3	(4,1)	99,3	BC	84,3	BC	98,8	BC	98,4	BC	86,3	BC	86,9	BC
P0688 D3	(2,0)	98,4	BC	99,7	BC	99,8	BC	98,8	BC	91,6	BC	99,8	BC
P0688 D3	(1,0)	87,7	BC	97,8	BC	99,8	BC	98,6	-	79,0	BC	80,6	BC
P0688 D3	(0,5)	45,3	-	25,5	-	15,9	-	34,6	-	55,6	-	40,9	-
P0688 D3	(0,2)	50,5	-	13,2	-	4,3	-	19,8	-	7,4	-	24,5	-
P0688 E3	(17,2)	99,5	BE	96,4	BC	94,1	BC	96,7	BC	99,3	BC	98,3	BC
P0688 E3	(8,6)	98,2	BE	100	BC	94,1	BC	96,8	BC	99,6	BC	96,6	BC
P0688 E3	(4,3)	95,0	BE	69,0	BE	97,1	BC	97,7	BE	99,8	BC	95,9	BC
P0688 E3	(2,1)	33,7	-	49,9	BE	30,8	-	17,2	-	50,2	-	33,1	-
P0688 E3	(1,0)	37,7	-	0	-	37,1	-	34,2	-	44,9	-	36,1	-
P0688 E3	(0,5)	39,6	-	0	-	37,4	-	27,0	-	32,0	-	32,9	-
P0688 E3	(0,2)	46,9	-	0	-	7,0	-	34,4	-	40,3	-	32,3	-
P0688 E3	(0,1)	30,4	-	0	-	8,7	-	21,4	-	15,9	-	10,2	-

* (BC) Actividad bactericida; (BE) Actividad bacteriostática; (-) No hubo inhibición alguna

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **Rossana Katherine Rosales Dalgo** con CC.# **1722885181**, autor del trabajo de graduación intitulado **“Determinación de la capacidad antimicrobiana de extractos de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito- Católica (CEQCA) sobre cepas multirresistentes de Staphylococcus aureus”** previa la obtención del grado académico de licenciada en Ciencias Biológicas, en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 22 de noviembre del 2018

Rossana Katherine Rosales Dalgo

CC.# 1722885181